

# **Immunglobulinproduktion in B-Zellen von allergischen Kindern nach Stimulation mit verschiedenen Interleukinen**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena  
2008**

**von Christiane Rödiger, geb. Bach  
geboren am 26.07.1974 in Jena**

Gutachter:

1. PD Dr. Udo Markert, Placenta-Labor, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. Johannes Norgauer, Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. Gerhard Zwacka, Robert-Koch-Krankenhaus Apolda

Tag der öffentlichen Verteidigung: 08.12.2008

# Inhaltsverzeichnis

<b>Prolog.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>2</b>
1.1 Definition.....	2
1.2 Einteilung der allergischen Reaktionen nach Coombs und Gell.....	2
1.2.1 Typ-I-Reaktion.....	2
1.2.2 Typ-II-Reaktion.....	3
1.2.3 Typ-III-Reaktion.....	3
1.2.4 Typ-IV-Reaktion.....	3
1.3 Epidemiologie und Ätiologie .....	4
1.4 Allergene.....	5
1.5 Molekulare Mechanismen und Pathogenese.....	6
1.6 Diagnostik.....	10
1.6.1 Hauttestungen.....	10
1.6.2 In vitro Testungen.....	12
1.6.3 Provokationstestungen.....	12
1.7 Differentialdiagnosen: Pseudoallergie, Intoleranz.....	13
1.8 Therapie.....	13
1.8.1 Symptomatische Behandlung.....	13
1.8.2 Spezifische Immuntherapie.....	14
1.8.3 Weitere Therapieoptionen.....	20
1.9 Prävention.....	23
1.10 Forschungsansatz.....	23
<b>2 Ziele.....</b>	<b>23</b>
<b>3 Patienten, Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
3.1 Patientenauswahl und Therapieschema.....	23
3.2 Material.....	24
3.2.1 Arbeitsbedingungen.....	24
3.2.2 Zelllinien.....	25
3.2.3 Chemikalien.....	26
3.2.4 Puffer.....	27
3.2.5 Weitere Materialien.....	28
3.2.6 Allergene und Antikörper.....	29

3.3 Methoden.....	30
3.3.1 Plasmaisolation.....	31
3.3.2 Ficoll - Dichtegradient (Lymphozytenseparation).....	31
3.3.3 B-Zell-Separation mittels MACS (Magnetic Activated Cell Separator).....	31
3.3.4 Bestimmung des Anreicherungsgrades der B-Zellen mittels FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter).....	32
3.3.5 B-Zell-Kultur / CD40-Assay.....	33
3.3.6 ELISA.....	34
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>36</b>
4.1 Zellkulturen und Kontrollansätze.....	36
4.2 Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher.....	40
4.2.1 Vergleich der relativen Immunglobulinproduktion mit den Kontroll- ansätzen.....	40
4.2.2 Vergleich der relativen Immunglobulinproduktion bei verschiedenen Interleukinkombinationen.....	40
4.2.3 Vergleich der relativen Immunglobulinproduktion bei Patienten unter sublingualer Immuntherapie mit den relativen Konzentrationen bei Patienten vor Therapiebeginn.....	41
4.3 Patienten mit einer Allergie auf Gräserpollen.....	46
4.3.1 Vergleich der relativen Immunglobulinproduktion mit den Kontroll- ansätzen.....	46
4.3.2 Vergleich der relativen Immunglobulinproduktion bei verschiedenen Interleukinkombinationen.....	46
4.3.3 Vergleich der relativen Immunglobulinproduktion bei Patienten unter sublingualer Immuntherapie mit den relativen Konzentrationen bei Patienten vor Therapiebeginn.....	47
4.4 Patienten mit einer Allergie auf Hausstaubmilben.....	52
4.4.1 Vergleich der relativen Immunglobulinproduktion mit den Kontroll- ansätzen.....	52
4.4.2 Vergleich der relativen Immunglobulinproduktion bei verschiedenen Interleukinkombinationen.....	52
4.4.3 Vergleich der relativen Immunglobulinproduktion bei Patienten unter sublingualer Immuntherapie mit den relativen Konzentrationen bei Patienten vor Therapiebeginn.....	53

4.5 Immunglobulin A.....	58
4.5.1 Vergleich der relativen IgA-Produktion durch Stimulation verschiedener Interleukine und deren Kombinationen.....	58
4.5.2 Vergleich der relativen IgA-Produktion vor und während der spezifischen Immuntherapie.....	59
4.6 Immunglobulin G.....	61
4.6.1 Vergleich der relativen IgG-Produktion durch Stimulation verschiedener Interleukine und deren Kombinationen.....	61
4.6.2 Vergleich der relativen IgG-Produktion vor und während der spezifischen Immuntherapie.....	62
4.7 Immunglobulin M.....	64
4.7.1 Vergleich der relativen IgM-Produktion durch Stimulation verschiedener Interleukine und deren Kombinationen.....	64
4.7.2 Vergleich der relativen IgM-Produktion vor und während der spezifischen Immuntherapie.....	65
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>66</b>
5.1 B-Zell-Kultur-System (CD40-Assay).....	66
5.2 Interleukin 4.....	69
5.3 Interleukin 6.....	70
5.4 Interleukin 10.....	71
5.5 Interleukin 11.....	73
5.6 Interleukin 13.....	75
5.7 Schlussfolgerungen.....	76
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>77</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>IV</b>
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Literaturverzeichnis.....	X
Lebenslauf.....	XIX
Danksagung.....	XXI
Ehrenwörtliche Erklärung.....	XXII

---

## Prolog

Auszug aus "Allergie"

von Clemens von Pirquet (1874-1929)

Muenchener Medizinische Wochenschrift vom 24.Juli 1906

"In den letzten Jahren ist eine Reihe von Tatsachen gesammelt worden, welche in den Bereich der Immunitätslehre gehören, aber unter diesen Namen schlecht passen: die Befunde von Ueberempfindlichkeit am immunisierten Organismus.

Diese beiden Ausdrücke schreien gegeneinander; unter immun stellen wir uns doch einen Organismus vor, welcher gegen eine Krankheit geschützt ist, von ihr nicht mehr angegriffen wird; und der soll gleichzeitig gegenüber derselben Krankheit überempfindlich sein? ...

Wir brauchen ein neues, allgemeines, nicht präjudizierendes Wort für die Zustandsänderung, die der Organismus durch die Bekanntschaft mit irgend einem organischen, lebenden oder leblosen Gifte erfährt. ... Für diesen allgemeinen Begriff der veränderten Reaktionsfähigkeit schlage ich den Ausdruck *A l l e r g i e* vor. Allos bezeichnet die Abweichung von der ursprünglichen Verfassung, von dem Verhalten des Normalen, ...

Ein Fremdkörper hinwiederum, welcher den Organismus durch ein- oder mehrmalige Einverleibung zu einer Veränderung der Reaktion beeinflusst, ist ein *A l l e r g e n*.

... Die Ueberempfindlichkeit ist ein neues Arbeitsgebiet, auf dem erst in den letzten Jahren die Bildung der Begriffe unter mühsamer Anpassung an alte Namen stattgefunden hat. Aus dem Bedürfnis heraus, in diese Begriffsbildung Klarheit zu bringen, schlage ich die neuen Bezeichnungen vor und hoffe, dass ich durch die Vereinfachung der äusseren Formen neuen Mitarbeitern eine Erleichterung des Studiums der interessanten Vorgänge auf diesem Gebiete schaffen werde."

# 1 Einleitung

## 1.1 Definition

Der Franzose Clemens von Pirquet hat vor über 100 Jahren, im Jahre 1906 als erster den Begriff „Allergie“ definiert, seine Begriffsbestimmung gilt auch heute noch. Demzufolge ist Allergie die veränderte, d.h. gesteigerte oder verminderte Reaktionsweise („Andersempfindlichkeit“) eines Organismus, im engeren Sinne die zu krankhafter Immunantwort (Überempfindlichkeitsreaktion) führende Reaktionsänderung auf Grund einer Sensibilisierung durch ein Allergen. Der Wortbestandteil „all“ kommt aus dem Griechischen und bedeutet „anders“. Der Körper reagiert auf harmlose, z.T. nützliche oder sogar lebensnotwendige Faktoren mit einer inadäquaten Immunantwort. Sensibilisierung durch ein Allergen bedeutet, dass der Körper erst beim Zweitkontakt mit dem auslösenden Agens mit Symptomen von Krankheitswert reagiert. Eine Allergie ist somit eine erworbene spezifische Änderung der Reaktionsfähigkeit des Organismus gegenüber einer körperfremden Substanz infolge einer immunologischen Reaktion (Jung 1995, Roche Lexikon Medizin 1987).

Des Weiteren kennt man den von Coca und Cooke 1923 eingeführten Begriff der Atopie (Grevers und Röcken 2001). Atopie wird gleichbedeutend verwendet mit der vererbten Neigung, eine empfindliche Haut und / oder Schleimhaut zu haben und dementsprechend Erkrankungen wie Atopische Dermatitis, allergische Rhinokonjunktivitis oder allergisches Asthma bronchiale entwickeln zu können.

## 1.2 Einteilung der allergischen Reaktionen nach Coombs und Gell

Coombs und Gell erstellten im Jahre 1963 eine noch heute gültige Klassifikation, in der die pathogenen Immunreaktionen in 4 Haupttypen unterteilt werden (Abb.1).

### 1.2.1 Typ-I-Reaktion

Die Typ-I-Reaktion, auch Reaktion vom Soforttyp oder vom anaphylaktischen Typ genannt, wird durch IgE-Antikörper vermittelt, die sich meist gegen Pollen, Tierhaare, Hausstaubmilben, Nahrungsmittel oder Insektengift richten. IgE-tragende Mastzellen setzen nach Antigenbindung Mediatoren frei, wobei zwei benachbarte Mastzellen durch ein Antigen überbrückt werden müssen, um das Signal zur Degranulation der Zellen und damit zur Freisetzung der vasoaktiven Mediatoren, v.a. Histamin auszulösen. Zu den Symptomen der allergischen Sofortreaktion gehören die Vasodilatation (Erythem), die Steigerung der Gefäßpermeabilität

(Ödem), die Kontraktion der glatten Muskulatur (Bronchospasmus, Koliken), die Hypersekretion der Schleimhäute (Rhinitis) und der Juckreiz. Zu den Typ-I-Reaktionen zählen die allergische Rhinitis, das allergische Asthma bronchiale, die Urtikaria, die Nahrungsmittelallergie, die Insektengiftallergie und der anaphylaktische Schock (Jung 1995).

### **1.2.2 Typ-II-Reaktion**

Typ II fasst die Reaktionen vom zytotoxischen Typ zusammen. Die Zellzerstörung wird entweder direkt durch den Antikörper oder durch aktiviertes Komplement nach Antigen-Antikörper-Reaktion an der Zielzelle, meist an Blutzellen ausgelöst. Klinische Beispiele sind medikamentös induzierte hämolytische Anämien, Agranulozytosen und Thrombozytopenien sowie eine Art der Glomerulonephritis (Jung 1995).

### **1.2.3 Typ-III-Reaktion**

Typ III ist die Reaktion vom Immunkomplex-Typ, zirkulierende oder gewebsständige Immunkomplexe aktivieren Komplement, wodurch hochwirksame Entzündungsmediatoren gebildet werden. Bei der Phagozytose der Immunkomplexe durch Granulozyten werden lysosomale Enzyme sezerniert, die das Gewebe schädigen. Hierzu zählen die allergische Vaskulitis, Gefäß- und Gewebsschäden bei den sogenannten Immunvaskulitiden, die allergische Alveolitis und die Serumkrankheit (Jung 1995).

### **1.2.4 Typ-IV-Reaktion**

Typ IV ist die Reaktion vom Spättyp oder auch zellulärer Typ genannt. Spezifisch sensibilisierte T-Lymphozyten sezernieren nach Antigenkontakt Lymphokine. Klinische Symptome entwickeln sich erst 24-48 Stunden nach Antigenexposition. Häufigstes Beispiel ist das allergische Kontaktekzem, aber auch die Tuberkulinreaktion, die Transplantatabstoßung und Arzneiexantheme zählen dazu (Jung 1995).

In dieser Arbeit werden ausschließlich die Allergien vom Sofort-Typ, Typ I nach Coombs und Gell betrachtet.



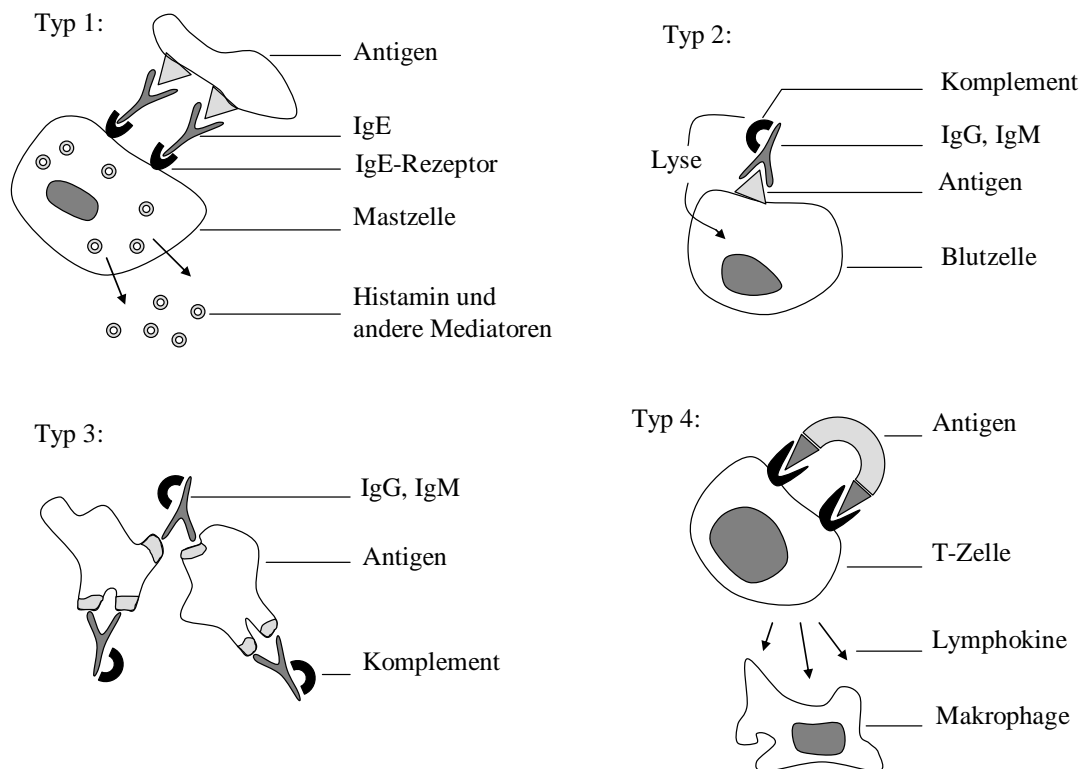


Abb. 1: Einteilung der allergischen Reaktionen nach Coombs und Gell  
(nach Jung. Dermatologie. Hippokrates Verlag Stuttgart. 1995)

### 1.3 Epidemiologie und Ätiologie

In Deutschland erkranken ca. 25-30% der Kinder und Jugendlichen an einer Allergie. Als Ursachen für die Entstehung von Allergien werden verschiedene Bedingungen diskutiert, v.a. das Erbgut und die Umwelt. Die Allergie ist eine der häufigsten Umwelterkrankungen, in Industrieländern nimmt ihre Häufigkeit stetig zu. Als Gründe werden der steigende Medikamentenkonsum, die fortschreitende Chemisierung der Umwelt, die Schädigung der Schleimhautbarrieren durch Luftverschmutzung und psychovegetative Faktoren in Betracht gezogen (Jung 1995). Von ebenso großer Bedeutung ist das Erbgut. Ist ein Elternteil betroffen, verdoppelt sich das Risiko, an einer Allergie zu erkranken von 15% auf 30%, bei zwei betroffenen Familienmitgliedern 1. Grades nochmals auf ca. 60%. Bereits in utero kann die Entwicklung von Allergien begünstigt werden, intrauterine Faktoren aus der maternalen Umwelt, z.B. die Ernährung oder die Tabakrauchexposition der Schwangeren beeinflussen die Entwicklung des fetalen Immunsystems (Devereux et al. 2002). Auch die Lebensführung spielt bei der Entstehung von Allergien eine gewisse Rolle, so kann eine Reizung der Schleimhäute nicht nur durch

Umweltverschmutzung sondern auch durch Rauchen, Alkohol oder häufiges Auftreten von Infektionen das Entstehen von Allergien begünstigen. Weiter gibt es Hinweise, dass Allergien zunehmen, weil die Kinder frühzeitig mit Antibiotika behandelt wurden, da orale Antibiotika die Darmflora beeinflussen können (Oyama et al. 2001). Bei Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass die Balance zwischen  $T_{H1}$ - und  $T_{H2}$ -Zellen durch eine Antibiotika-Gabe gestört wurde (Oyama et al. 2001).

Trotz intensiver Ursachenforschung und aufklärender Prävention nimmt die Anzahl der Allergien weiterhin zu. Neueren Vorstellungen zufolge ist bei allergischen Erkrankungen durch Ursachenerkennung eine Primärprävention möglich (Schultze-Werninghaus und Przybilla 2001). Das vormals gültige Konzept einer allergenfreien Umgebung für die ersten Lebensmonate eines Kindes wird mehr und mehr verdrängt von den Vorstellungen, dass vielmehr eine "natürliche" Umgebung zu einer Verminderung von Allergien führen könnte, gemäß dem Motto "A yoghurt a day keeps the allergist away" (Schultze-Werninghaus und Przybilla 2001, Kalliomäki et al 2001).

## 1.4 Allergene

Ein Allergen, das IgE-vermittelte Reaktionen vom Soforttyp auslöst, ist meist ein komplexes Molekül (Protein oder Glykoprotein). Es setzt sich aus einer großen Anzahl von Aminosäuren in definierter Reihenfolge (Primärstruktur) zusammen, die eine bestimmte räumliche Anordnung (Sekundärstruktur) zueinander einnehmen. Mehrere Untereinheiten eines solchen Moleküls falten sich oft charakteristisch auf (Tertiärstruktur) (Klimek et al. 1997).

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit untersuchten Allergene kurz beschrieben werden.

Frühblüher, z.B. Birke (*Betula*) oder Hasel (*Corylus avellana* L.):

Baumpollen lösen am häufigsten Allergien aus. Birkenpollen gelten als sehr aggressive Allergene. In Skandinavien ist die Birkenpollenallergie die häufigste, während sie im Mittelmeerraum kaum eine Rolle spielt. Haselpollen zählen ebenfalls zu den aggressiven Allergenen, sie stehen an zweiter Stellen der Sensibilisierung durch Baumpollen (Klimek et al. 1997).

Gräser, z.B. Wiesenlieschgras (*Phleum pratense*):

Das Wiesenlieschgras enthält eines der häufigsten Gräserpollenallergene. Die allergene Bedeutung wird in Verbindung mit anderen Gräserpollen als sehr hoch eingestuft. Es kommt auf Fettwiesen, Parkrasen und nährstoffreichen, mäßig feuchten Böden vor (Klimek et al. 1997).

Hausstaubmilbe (*Dermatophagoides pteronyssinus*):

Die Hausstaubmilben sind in den meisten Haushalten weltweit verbreitet, sie leben intramural und saprophytär in Bettzeug, Matratzen, auf Teppichen, Haustieren, Polstermöbeln und Stoff-

tieren. Maximale Milbenkonzentrationen findet man im Spätsommer und Herbst. Die Hauptallergenquellen sind die Exkremente der Milben (Klimek et al. 1997).

Die Hersteller von natürlich gewonnenen Allergenextrakten verwenden unterschiedliche Standardisierungsmethoden, so dass die Qualität der zugelassenen Extrakte nicht exakt vergleichbar ist. Es gibt Extrakte mit unbehandelten „nativen“ Allergenen und chemisch modifizierte Extrakte, die sogenannten Allergoide (Kleine-Tebbe et al. 2003). Zur Herstellung individueller Mischungen sollte das Prinzip möglichst weniger Komponenten, d.h. nur Hauptallergene berücksichtigt werden (Sennekamp et al. 2002). Zudem sollten saisonale nicht mit ganzjährigen Allergenen in einem Injektionsextrakt gemischt verabreicht werden.

### **1.5 Molekulare Mechanismen und Pathogenese**

In der Umwelt gibt es viele Moleküle mit bestimmten Epitopen, gegen die im Prinzip eine Immunreaktion eingeleitet werden kann. Oft reagiert der Organismus auf solche Umweltreize mit Bildung von Antikörpern oder zellulärer Effektoren, allerdings ohne dass nennenswerte Symptome entstehen. Entsprechend der genetischen Konstitution (Atopie), der Intensität der Exposition und der Intaktheit der unspezifischen Barrieren kann es zu Immunreaktionen im Sinne von Allergien kommen (Kayser et al. 1993).

Die Allergene können sowohl über die äußeren als auch über die inneren Körperoberflächen (Haut, Epithel des Respirations- und des Gastrointestinaltraktes, Konjunktiven) in den Organismus gelangen, wo sie von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) phagozytiert und in deren Endosomen durch Proteasen prozessiert werden (Abb. 2). APC sind spezialisierte Leukozyten der Monozyten - Makrophagenreihe. Die dendritischen Zellen der Lymphknoten und die Langerhanszellen der Haut sind die bedeutendsten APC. Zu den schwächeren APC zählen die Makrophagen und die B-Lymphozyten (Grevers und Röcken 2001).

Antigenpräsentierende Zellen erkennen Fremdantigene in peripheren Organen, können diese in Peptide zerlegen und an ihrer Oberfläche in der Präsentationsrinne der MHC-Moleküle ausstellen, den T-Zellen "präsentieren". MHC (major histocompatibility complex) ist ein membrangebundenes Molekül, welches T-Zell-Epitope präsentiert. Es kann in Klasse I, exprimiert auf allen kernhaltigen Zellen des Organismus, und Klasse II, nur auf spezialisierten Zellen zu finden (wie B-Zellen, Makrophagen oder dendritischen Zellen), eingeteilt werden (Kayser et al. 1993; Klimek et al. 1997).

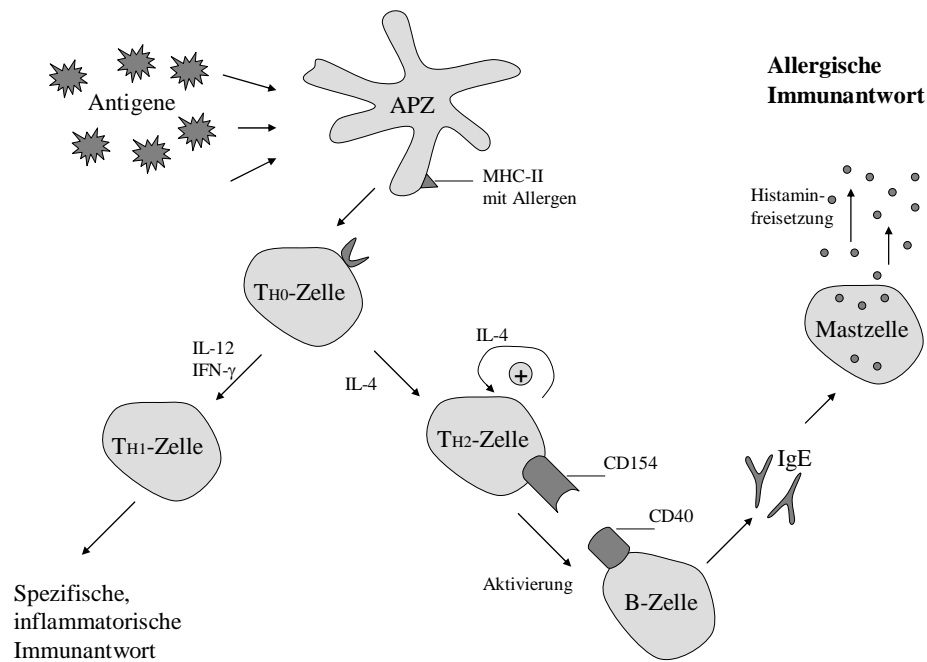


Abb. 2: Pathomechanismus der allergischen Reaktion vom Sofort-Typ

Das so aufbereitete Allergen wird nun den T-Zellen in den lokalen Lymphknoten präsentiert (Kripke et al. 1990). Die T-Zellen lassen sich in zwei Untergruppen einteilen, die CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Zellen und die CD8<sup>+</sup>-T-Suppressorzellen, auch CD8<sup>+</sup>-Zytotoxische-T-Zellen genannt. Weiterhin kann man die CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Zellen entsprechend ihrer Interleukinproduktion in T<sub>H0</sub>-, T<sub>H1</sub>- und T<sub>H2</sub>-Zellen gliedern, wobei die T<sub>H0</sub>-Zellen die Fähigkeit besitzen, sich sowohl in T<sub>H1</sub>- als auch in T<sub>H2</sub>-Zellen zu differenzieren, abhängig von verschiedenen kostimulatorischen Signalen. Beispielsweise fördert IL-12 die T<sub>H1</sub>-Entstehung und IL-4 die T<sub>H2</sub>-Entwicklung (Modlin 1994). T<sub>H1</sub>-Zellen bilden v.a. IFN-γ, TNF-β, IL-2, IL-12 oder IL-18, T<sub>H2</sub>-Zellen dagegen eher IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 (Mosmann et al. 1986). Allerdings sind auch zahlreiche Interleukine bekannt, die von beiden T-Zell-Typen produziert werden können, wie z.B. IL-3, IL-10 und TNF-α (Mosman und Sad 1996; Romagnani et al. 1997). Außerdem können sich beide T-Zell-Arten mit Hilfe der Produktion bestimmter Interleukine gegenseitig beeinflussen, so hemmt z.B. IFN-γ die T<sub>H2</sub>-Antwort und IL-4 oder IL-10 die T<sub>H1</sub>-Antwort (Maggi et al. 1992). T<sub>H1</sub>-Zellen induzieren über Zytokine organspezifische entzündliche Immunantworten, T<sub>H2</sub>-Zellen bremsen diese Reaktion und stimulieren stattdessen die IgE-Produktion in den B-Lymphozyten (Grevers und Röcken 2001).

Nur die T-Helfer-Zellen, die den entsprechenden passenden T-Zell-Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen, können den MHC-II-Komplex mit dem aufbereiteten Allergen erkennen und

werden so aktiviert, vermehren sich und können in das entsprechende Gewebe als Memory-T-Zellen zurückkehren. Diesen Vorgang nennt man Homing (Picker 1994). Zur vollständigen Aktivierung der T-Zellen werden neben dem T-Zell-Rezeptor und dem MHC-Molekül der APC mit dem Antigen weitere Adhäsionsmoleküle sowie kostimulatorische Signale benötigt. Adhäsionsmoleküle wie z.B. ICAM-1 oder LFA-1 sind für die Zellaffinität bedeutend, sie stabilisieren den Zell-zu-Zell-Kontakt. Zu den kostimulatorischen Molekülen zählen lösliche Mediatoren wie Interleukine und membranständige Moleküle wie CD28 und CTLA4 auf den T-Zellen und CD40, CD80 und CD86 auf den APC (Johnson und Jenkins 1992). Die aktivierten T-Helfer-Zellen haben dann die Aufgabe, in den B-Lymphozyten die Immunglobulinproduktion und damit die spezifische Immunantwort einzuleiten. Zudem werden durch die aktivierten T-Helfer-Zellen aber auch unspezifische Effektoren der Immunantwort wie z.B. Makrophagen und Monozyten aktiviert (Grevers und Röcken 2001). Im Rahmen der spezifischen Immunantwort sind die B-Zellen für die Produktion von Immunglobulinen (Ig), auch Antikörper (Ak) genannt, verantwortlich (Grevers und Röcken 2001).

Es gibt fünf Klassen von Immunglobulinen (Tab. 1), deren Grundstruktur gleich ist. Sie bestehen aus 2 leichten (L = light chain) und 2 schweren (H = heavy chain) Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Jung 1995). Sie haben je einen variablen und einen konstanten Anteil, wobei die variablen Abschnitte an die Antigene binden können und so die Antigenspezifität der Immunglobuline bestimmen. Die Klassen der Immunglobuline unterscheiden sich in der Primärstruktur ihrer schweren Ketten.

75-80% aller Immunglobuline beim Menschen sind IgG (Center und Weck 2000). Sie haben ein Molekulargewicht von 150.000 Dalton und können die Plazentaschranke überwinden (Jung 1995). IgG wird hauptsächlich bei der sekundären Immunantwort gebildet, bei der Antigenreexposition d.h. bei der zweiten Begegnung mit einem Antigen (Jung 1995). Die Sekretion von IgG wird von der Zusammenarbeit zwischen B-Lymphozyten und T-Lymphozyten moduliert (Center und Weck 2000).

Ca. 15% der Plasma-Immunglobuline wird vom IgA dargestellt (Center und Weck 2000). IgA hat ein Molekulargewicht von 160.000 Dalton und liegt meist in dimerer Form vor (Jung 1995). Man findet es v.a. in Körpersekreten bzw. auf den Schleimhäuten. Es ist hauptsächlich verantwortlich für die Abwehr im Bereich der Schleimhäute und dabei für die Elimination von verschiedenen Antigenen.






IgM stellen ca. 10% der Immunglobuline dar. Sie sind Pentamere und haben ein Molekulargewicht von 970.000 Dalton, es wird auch als Makroglobulin bezeichnet (Jung 1995). IgM stellen die Antikörper der frühen Immunantwort (primary reaction) dar und sind nur kurzlebig

(Center und Weck 2000). Während IgG eine Halbwertszeit von ca. 21 Tagen haben, liegt diese bei IgA und IgM nur bei 5-6 Tagen (Klimek et al. 1997).

IgD ist nur in sehr geringer Anzahl vorhanden. Es findet sich auf der Oberfläche von Lymphozyten bevor IgM exprimiert werden und hat ein Molekulargewicht von 184.000 Dalton. Die immunologische Bedeutung ist noch nicht vollständig geklärt, erhöhte Konzentrationen zeigen sich bei D-Myelomen oder Kwashiorkor (Eiweiß- und Vitaminmangelzustand bei einseitiger Ernährung und Unterernährung) (Center und Weck 2000).

Allergologisch bedeutsam ist das IgE. Es hat ein Molekulargewicht von 188.000 Dalton und findet sich normalerweise nur in Spuren im Blut (Jung 1995). Bei Patienten mit Typ-I-Allergien bzw. atopischer Veranlagung können sehr hohe Spiegel gemessen werden. Aber auch bei anderen Erkrankungen spielen IgE eine bedeutende Rolle, wie z.B. bei Parasitosen, Myelomen, bei der Masernerkrankung, der Mononukleose oder dem Morbus Hodgkin (Center und Weck 2000).

Tab. 1: Immunglobulintypen

Name	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Form					
Anteil	75-80%	15%	10%	< 2%	verschieden
Gewicht	150.000 Dalton	160.000 Dalton	970.000 Dalton	184.000 Dalton	188.000 Dalton

B-Zellen bleiben immer für dasselbe Antigen spezifisch, aber sie können ihren Isotyp wechseln. Dieser Immunglobulinswitch wird über T-Zell-Zytokine reguliert, die mittels membranständiger Januskinasen und so genannter STAT-Faktoren die Gene der spezifischen Isotypen aktivieren. So muss z.B. IL-4 oder IL-13 an den entsprechenden Rezeptor binden, damit die B-Zelle IgG4 oder IgE produziert (Grevers und Röcken 2001). Die Produktion von IgE durch die B-Lymphozyten unter Stimulation durch die aktivierten T-Helfer-Zellen ist der Abschluss der Sensibilisierungsphase der allergischen Reaktion vom Soforttyp.

IgE kann an drei verschiedenen Strukturen spezifisch gebunden werden, am hochaffinen IgE-Rezeptor  $Fc_\epsilon RI$ , am niedrigaffinen IgE-Rezeptor  $Fc_\epsilon RII$  oder CD23 oder am IgE-bindenden Protein  $\epsilon$ -BP, wobei die beiden letzteren häufiger anzutreffen sind. Ihre Aufgabe besteht

wahrscheinlich in der Aufrechterhaltung der IgE-Homöostase.  $\text{Fc}_\epsilon\text{RI}$  ist nur auf Basophilen bzw. Mastzellen und auf antigenpräsentierenden Zellen zu finden (Bieber et al. 1992). Die Bindung des allergenspezifischen IgE am  $\text{Fc}_\epsilon\text{RI}$  hat sowohl auf die Signalübertragung als auch auf die Antigenpräsentation einen positiven Einfluss (Maurer und Stingl 1995).

Bei wiederholtem Kontakt mit einem Allergen nach erfolgter Sensibilisierung kann es zur Mastzell- bzw. Basophilendegranulation kommen, wenn mehrere  $\text{Fc}_\epsilon\text{RI}$ -gebundene Moleküle kreuzvernetzt werden. Diese Degranulation führt zur Freisetzung von verschiedenen Mediatoren, wie z. B. Histamin, Prostaglandinen und Leukotrienen, Kininen, Zytokinen, Proteasen und Proteoglykanen, was eine Sofortreaktion am Ort der Allergenexposition oder eine systemische anaphylaktische Reaktion hervorrufen kann.

## **1.6 Diagnostik**

Der Schwerpunkt der Diagnostik liegt in der allergologischen Anamnese. Des Weiteren stehen verschiedene in-vivo- und in-vitro-Testungen zur Verfügung.

### **1.6.1 Hauttestungen:**

Hauttestungen sind in-vivo-Tests zum Nachweis oder Ausschluss einer Sensibilisierung, bei denen Allergene in definierter Weise dem Patienten appliziert werden. Sie gehören nach der Anamnese an die zweite Stelle der Diagnostik allergischer Erkrankungen. Zur Diagnostik von Typ-I-Allergien kommen der Prick-Test, der Intracutan-Test, der Scratch-Test und der Reibtest zur Anwendung. T-Zell-vermittelte Reaktionen (Typ IV) können mit Hilfe des Epikutan-Tests nachgewiesen werden.

Reib-Test:

Der Reib-Test ist der technisch einfachste Hauttest. Bei Verdacht auf Vorliegen einer hochgradigen Sensibilisierung wird das meist native Material auf der Unterarminnenseite kreisförmig reibend aufgebracht. Die Ablesung der Reaktion erfolgt nach 20 Minuten.

Pricktest:

Im Prick-Test wird eine dosierte Allergenmenge unter Verwendung von Standardlanzetten in die Haut geprickt. Pricktestextrakte sind mit 50% Glycerin stabilisiert und behalten so in der Regel ihre allergene Potenz längere Zeit und müssen nicht in sterilen Gefäßen aufbewahrt werden. Dieser Test hat ausreichende Sensitivität und Spezifität und ist auch bei Kindern anwendbar. Der Scratch-Test ist eine Variante der Pricktestung unter Verwendung von nativem Material, allerdings ist die Allergenmenge nicht dosiert.

#### Intrakutantest:

Im Intrakutan-Test wird eine definierte, kommerziell hergestellte Allergenlösung intrakutan appliziert. Dieser Test hat eine höhere Sensitivität, ist aber auch risikoreicher als der Prick-Test, mit z.T. falsch positiven Ergebnissen. Die Haltbarkeit der Extrakte beträgt nur 3-6 Monate, eine sterile Aufbewahrung ist notwendig.

Zusätzlich müssen bei den o.g. Hauttestungen physiologische Kochsalzlösung und Histamin als Kontrolllösungen getestet werden. Nach 20 Minuten werden der Quaddel- und der Erythemdurchmesser als Grad für die Sensibilisierung gemessen.

#### Epikutantest:

Im Epikutantest können Kontaktsensibilisierungen erfaßt werden. Standardisierte Testsubstanzen auf Testpflastern werden über 48 Stunden appliziert. Nach 48 und 72 Stunden wird die Testreaktion, d.h. die Größe der Infiltrate abgelesen. Zu beachten ist die toxische Reaktion als Differentialdiagnose zur Allergie.

Diese o.g. Testungen können aus verschiedenen Gründen zur Anwendung kommen, z.B. als Bestätigungstest, bei dem bestimmte Allergene, die auf Grund der Anamnese als Auslöser für die angegebenen Beschwerden verdächtig sind, zur Bestätigung gezielt getestet werden. Weiterhin gibt es die Möglichkeit sogenannte Suchtests durchzuführen. Bei Verdacht auf das Vorliegen einer allergischen Genese von Symptomen (z.B. Urtikaria), ohne dass auf Grund der Anamnese spezielle Allergene verdächtigt werden können, wird eine Auswahl von Allergenen getestet, wobei ein positives Ergebnis durch ergänzende Untersuchungen zu überprüfen ist (z.B. RAST, Provokation). Außerdem werden die Hauttestungen vor Einleiten einer spezifischen Immuntherapie (Hyposensibilisierung) als diagnostische Grundlage und Erfassung des Sensibilisierungsgrades verwendet.

Ein positiver Hauttest ist nicht gleichzusetzen mit einer Allergie. Es wird lediglich eine Sensibilisierung auf das getestete Allergen nachgewiesen. Er sagt nichts über die aktuelle klinische Relevanz des Allergens für den Patienten aus und muss demzufolge immer im Zusammenhang mit den anamnestischen Angaben gesehen werden. Die Aussagefähigkeit unter Verwendung von kommerziellen Extrakten ist bei den einzelnen Allergenen unterschiedlich. Kurz nach einer allergischen Reaktion können Testergebnisse infolge von Antikörperverbrauch falsch negativ sein. Nach Vorliegen des Tests sollte entschieden werden, inwieweit der direkte Nachweis spezifischer Antikörper zur Vervollständigung der Diagnostik notwendig ist. Tests beeinflussende Medikamente wie Antihistaminika, hochdosierte Kortikoide, Sedativa und manche Antidepressiva müssen vorher abgesetzt werden.



### **1.6.2 In vitro Testungen**

Des Weiteren werden neben ausführlicher Anamnese und Hauttestungen so genannte in vitro Untersuchungen durchgeführt. Dazu gehören z.B. der RAST (Radio-Allergo-Sorbent-Test) oder der ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay) zur Bestimmung von Immunglobulinen. Bei diesen laborchemischen Untersuchungen wird das Patientenserum mit dem an eine feste Substanz gebundenen Antikörper der zu bestimmenden Substanz inkubiert. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex kann mittels eines Chromogens messbar gemacht werden (Grevers und Röcken 1995). Die Bestimmung des Gesamt-IgE-Spiegels im Serum hat eine orientierende Bedeutung. Deutlich erhöhte Werte (Normwert altersabhängig ca. bis 100 IU/ml) deuten auf eine Sensibilisierung hin. Bei Atopikern können Werte  $> 5.000$  IU/ml gemessen werden. Aber auch bei anderen Erkrankungen können erhöhte Gesamt-IgE-Spiegel festgestellt werden, z.B. bei Parasitosen, angeborenen Immundefekten oder unter immunsupprimierender Therapie. Zudem kann die Konzentration spezifischer IgE für verschiedene Allergene bestimmt werden. Die gemessenen IgE-Werte werden in 6 so genannten CAP-Klassen angegeben, wobei darauf hingewiesen werden muss, dass wie bei vielen in-vitro-Testungen zwar die Konzentration der gebildeten Antikörper bestimmt werden kann, aber keine Aussage zur klinischen Relevanz und zur Intensität der Allergie möglich ist (Grevers und Röcken 1995).

### **1.6.3 Provokationstestungen**

Zur Vervollständigung der Diagnose können Provokationstestungen des betroffenen Organs durchgeführt werden. Dabei wird das verdächtige Allergen konjunktival, nasal, bronchial oder subkutan appliziert. Bei der konjunktivalen Provokation wird nach Einbringen einer Kontrolllösung in den Konjunktivalsack eine sterile Allergenlösung appliziert und nach 20 Minuten die Rötung des Auges und das subjektive Empfinden des Patienten beurteilt. Im Gegensatz dazu kann bei der nasalen Provokation zur besseren Objektivierbarkeit der Symptome eine Rhinomanometrie durchgeführt werden. Dabei wird der nasale Atemstrom vor und nach Provokation gemessen. Die bronchiale Provokation wird meist dazu benutzt, eine bronchiale Hyperreagibilität zu diagnostizieren bzw. auszuschließen und dient nicht primär dazu, eine spezifische Sensibilisierung zu bestätigen. Ebenso wird die subkutane Provokationstestung vorrangig zur Testung der Verträglichkeit von Substanzen, v.a. Medikamenten eingesetzt. Bei Verdacht auf Vorliegen einer Nahrungsmittel- und Arzneimittelallergie sind zur Sicherung der Verträglichkeit orale Provokationen anzuschließen. Unter stationären Bedingungen und Infusionsschutz bekommt der Patient doppelblind placebokontrolliert die zu testende Substanz zu schlucken.

## **1.7 Differentialdiagnosen: Pseudoallergie, Intoleranz**

Pseudoallergische Reaktionen zeigen lediglich die klinischen Symptome einer Allergie, sind aber nicht immunologisch bedingt. Schon bei Erstkontakt mit der entsprechenden Substanz können sie auftreten. Der Pathomechanismus erfolgt über die direkte Ausschüttung von Histamin oder über unspezifische, antikörperunabhängig aktivierbare Effektorsysteme, z.B. das Komplementsystem oder über Kinine. Auslöser für Pseudoallergien können z.B. Analgetika, Röntgenkontrastmittel oder Nahrungsmittel sein (Jung 1995).

Intoleranz, auch Unverträglichkeit genannt, entsteht z.B. wenn dem Körper ein bestimmtes Enzym fehlt. So ist die Milchunverträglichkeit, die so genannte Laktoseintoleranz die Folge eines Laktasemangels. Die in der Milch enthaltene Laktose kann nicht abgebaut werden, es kommt zu Abdominalbeschwerden und Diarrhöen (Roche Lexikon Medizin 1987).

## **1.8 Therapie**

Grundsätzlich gibt es verschiedene Möglichkeiten der Therapie von Allergien, zum einen die Beeinflussung der Ursachen und zum anderen die Behandlung der Symptome. Die Therapie des allergischen Asthma bronchiale und der allergischen Rhinokonjunktivitis steht heute auf drei Säulen: der Expositionsprophylaxe, der symptomatischen Therapie und der Hyposensibilisierung (Zielen 2000). Die effektivste Variante ist sicher die Expositionsprophylaxe, d.h. die Allergenkenz, was leider nicht immer möglich ist.

### **1.8.1 Symptomatische Behandlung**

#### **Antihistaminika**

Zur Symptombehandlung werden v.a. Antihistaminika eingesetzt, die die Freisetzung und die Wirkung des Histamins verhindern bzw. abschwächen sollen. Histamin wirkt an drei verschiedenen Rezeptoren: H<sub>1</sub>-Rezeptoren übermitteln vorrangig allergische und pseudoallergische Reaktionen, H<sub>2</sub>-Rezeptoren dienen der Magensaftstimulation und haben positiv chronotrope und inotrope Wirkungen am Herzen, H<sub>3</sub>-Rezeptoren besitzen eine Neurotransmitterwirkung im ZNS. Ältere Antihistaminika wirken relativ rezeptorunspezifisch und erzielen daher oft starke anticholinerge, antiadrenerge, serotonin- und dopaminantagonistische Effekte. Sie werden nicht mehr als Antiallergika eingesetzt, können jedoch als Hypnotika, Antiemetika oder Psychopharmaka noch Verwendung finden. In der Allergologie werden Antihistaminika mit hoher Bindungsspezifität für H<sub>1</sub>-Rezeptoren benötigt. Während H<sub>1</sub>-Antagonisten der 1. Generation noch eine ausgeprägte sedierende Wirkung besitzen und ihre Einsetzbarkeit da-

durch stark eingeschränkt ist, lässt sich diese Nebenwirkung bei den Antihistaminika der 2. und 3. Generation meist nicht mehr nachweisen, so dass die Arbeits- und Fahrtauglichkeit kaum beeinträchtigt ist. H<sub>1</sub>-Antagonisten können sowohl systemisch als Tabletten, Tropfen, Saft oder Injektionen als auch lokal in Form von Nasenspray, Augentropfen oder Gelen Anwendung finden.

### **Glukokortikoide**

Weiterhin können im Rahmen der symptomatischen Therapie Glukokortikoide zur Anwendung kommen. Die Wirkungen der Glukokortikoide sind vielgestaltig. Sie schützen Zell- und Plasmamembranen, wodurch die Freisetzung von Enzymen verhindert und die erhöhte Kapillarpermeabilität normalisiert wird. Daraus folgend wird die Migration von Leukozyten und Mastzellen in das Gewebe reduziert. Glukokortikoide vermindern die Synthese von Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen. Des Weiteren hemmen sie die Synthese von TNF und IL-1, wodurch z.B. die Aktivierung von T-Lymphozyten beeinflusst wird. Eine Glukokortikoidtherapie bewirkt eine Zunahme von Neutrophilen im Blut und eine Abnahme von Lymphozyten, Monozyten, Eosinophilen und Basophilen. Nicht zuletzt wird die durch T-Lymphozyten vermittelte Zytotoxizität supprimiert (Grevers und Röcken 2001). Glukokortikoide können genau wie Antihistaminika lokal und systemisch angewendet werden. Bei kurzzeitiger fachgerechter Anwendung kann davon ausgegangen werden, dass keine irreversiblen, unerwünschten Nebenwirkungen auftreten.

### **Mastzellstabilisatoren**

Zusätzlich können zur Therapie Mastzellstabilisatoren Verwendung finden. Die Medikamente Dinatriumcromoglykat und Nedocromil stabilisieren die Zellwand von Mastzellen, in dem membranständige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle blockiert werden und somit bei einer allergischen Reaktion eine Degranulation der Zellen und demzufolge die Ausschüttung von Histamin verhindert werden kann (Grevers und Röcken 2001). Sie werden zur Prophylaxe eingesetzt.

## **1.8.2 Spezifische Immuntherapie**

Die einzige kausale und präventive (Kleine-Tebbe et al. 2003) Therapiemöglichkeit der Allergien vom Sofort-Typ ist die Spezifische Immuntherapie (SIT). Diese immunbiologische Therapie, auch Hypo- oder Desensibilisierung genannt, zählt zu den ältesten und gleichzeitig wirksamsten Immuntherapien (Grevers und Röcken 2001). Es soll die Funktion der T- und B-Lymphozyten beeinflusst werden, die für die spezielle Sensibilisierung verantwortlich sind. Hierbei wird das verantwortliche Allergen in steigender Dosis subkutan oder lokal verabreicht. Dieses Verfah-

ren geht auf Noon (1878 – 1913) zurück, der im Jahr 1911 die erste subkutane Desensibilisierung bei Gräserpollenallergikern mit rhinitischen Symptomen durchführte (Noon 1911). V.a. zur Therapie der Insektengiftallergie, der allergischen Rhinokonjunktivitis und des allergischen Asthma bronchiale ist es relativ erfolgreich. Grundlage für eine erfolgreiche Immuntherapie ist eine exakte Diagnostik mit ausführlicher Anamnese, Haut-, in vitro- und / oder Provokationstests (Sennekamp et al. 2002). Bestmögliche Motivation und Compliance des Patienten sind ebenfalls von großer Bedeutung.

### **Indikation**

Die spezifische Immuntherapie ist nach einem Positionspaper der European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI) dann indiziert, wenn die klinische Relevanz eines Allergens für die Auslösung der Beschwerden gesichert wurde, eine ausreichende Allergenkenz nicht möglich ist und eine Immuntherapie für das entsprechende Allergen sicher und effektiv belegt wurde (Klimek 2000). Nicht angewendet werden sollte die SIT bei Kindern unter 5 Jahren sowie bei klinisch stummen Sensibilisierungen ohne Symptomatik. Weiterhin sollte die SIT nicht während einer Schwangerschaft begonnen werden, allerdings kann die Fortsetzung einer vorher begonnenen SIT bei lebensbedrohlicher Allergie durch Insektengifte ratsam sein. Außerdem dürfen während der Behandlung keine  $\beta$ -Blocker, auch nicht in Form von lokalen Ophthalmika eingenommen werden, diese erhöhen das Risiko von unerwünschten Atemwegsreaktionen und können eine eventuell erforderliche Notfallbehandlung mit Adrenalin negativ beeinflussen. Auch ACE-Hemmer sollten möglichst nicht verordnet werden, da sie durch Eingriff in den Kinin-Metabolismus allergische Reaktionen möglicherweise verstärken können. Eine Therapie mit ACE-Hemmern stellt keine Kontraindikation für eine SIT mit Inhalationsallergenen dar (Kleine-Tebbe et al. 2003). Eine notwendige antiasthmatische und / oder antiallergische medikamentöse Therapie darf und sollte parallel zur Immuntherapie erfolgen (Sennekamp et al. 2002). Allerdings muss die applizierte Allergen-Dosis nach Absetzen der anti-allergischen Medikamente während der Immuntherapie reduziert werden.

### **Immunbiologische Wirkmechanismen**

Die immunbiologischen Wirkmechanismen der spezifischen Immuntherapie sind bis heute nicht vollständig bekannt, von einer Wirkung auf die T-Lymphozyten kann ausgegangen werden (Klimek 2000). Das Grundprinzip der klassischen Hyposensibilisierung ist die Applikation möglichst großer Allergenmengen. Die subkutane Applikationsform der SIT greift an antigenspezifischen T-Lymphozyten an (Kleine-Tebbe et al. 2003) und hat eine immunologische Normalisierung zum Ziel (Jacobson et al. 2000). Eine physiologische Immunantwort soll anstelle der pathologischen allergischen Reaktion erreicht werden.

Es kommt relativ rasch zu einer Verschiebung des  $T_{H1}$ -/  $T_{H2}$ -Verhältnisses zugunsten der  $T_{H1}$ -Zellen (Klimek 2000, Markert 1999), dieser Vorgang wird auch Immundeviation genannt (Jacobson et al. 2000). Die Funktion der  $T_{H2}$ -Zellen wird durch vermehrte Ausschüttung der immuninhibitorischen Zytokine TGF- $\beta$  und IL-10 aus regulatorischen Zellen gehemmt (Bellinghausen et al. 1997). Vermutlich ruft die Induktion des immunsuppressiv wirkenden Zytokins IL-10 eine immunologische Toleranz hervor (Jacobson et al. 2000). Allerdings ist noch nicht geklärt, ob die  $T_{H2}$ -Zellen in Richtung  $T_{H0}$ - oder  $T_{H1}$ -Zellen umorientiert oder funktionell inhibiert werden. Beide Möglichkeiten lassen sich experimentell erzeugen. Zusätzlich wird die Interferon- $\gamma$ -Produktion der  $T_{H1}$ -Zellen durch IL-12 aus antigenpräsentierenden Zellen nach Kontakt mit hohen Dosen des Antigens aus den Allergenextrakten stimuliert (Jacobson et al. 2000), wodurch die lokale IgE-Bildung und die Differenzierung der  $T_{H2}$ -Zellen gehemmt werden (Akdis und Blaser 2000). Weiterhin wird die Beteiligung von eosinophilen und basophilen Granulozyten an der allergischen Entzündung reduziert (Wilson et al. 2001). Die Immuntherapie führt außerdem zu einem Anstieg von allergenspezifischen IgG-Ak, die die Aufnahme und Präsentation von Allergenen durch antigenpräsentierende Zellen an T-Helferzellen hemmen (Jacobson et al. 2000). Folglich greift die SIT kausal an den pathophysiologischen Mechanismen der IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen an (Kleine-Tebbe und Kunkel 1994).

### **Wirksamkeit**

Durch zahlreiche klinische Studien wurde die Wirksamkeit der spezifischen Immuntherapie nachgewiesen, es konnte eine Reduktion des Medikamentenverbrauchs sowie eine Steigerung der Leistungsfähigkeit erzielt werden (Zwacka und Markert 2003). Weiterhin scheint die Immuntherapie den Etagenwechsel zu verhindern, d.h. die Ausweitung der klinischen Symptomatik und der Schleimhautveränderungen von den oberen auf die unteren Atemwege kann verhindert werden (Klimek 2000). Das Asthmarisiko für Kinder mit einer mittelschweren bis schweren saisonalen Rhinokonjunktivitis aber noch ohne Asthmabeschwerden kann durch eine SIT signifikant reduziert werden (Möller et al. 2002). Die allergische Rhinitis gilt als Vorstufe eines exogen-allergischen Asthma bronchiale. Bei 20-50% der unbehandelten Patienten mit allergischer Rhinitis tritt ein Etagenwechsel innerhalb von 5-15 Jahren auf (Klimek 2000).

### **Nebenwirkungen**

Im Verlauf einer SIT sind Nebenwirkungen im Sinne von unerwünschten lokalen Reaktionen, in seltenen Fällen systemische allergische Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock bekannt. An der Injektionsstelle können durch aluminiumadsorbierte Allergenextrakte v.a. bei sehr oberflächlicher subkutaner Applikation Granulombildungen entstehen (Wheeler 1997). Ein atopisches Ekzem kann exazerbieren oder erstmals auftreten, sich aber gelegentlich auch zu-

rückbilden (Sennekamp et al. 2002). Neben gesteigerten Lokalreaktionen an der Injektionsstelle kann es auch zu allergischen Allgemeinreaktionen kommen, die meist innerhalb von 30 Minuten nach der Injektion auftreten und sich als Konjunktivitis, Rhinitis, Juckreiz und Urtikaria, Angio-Ödem, Herzrhythmusstörungen, Hypotonie und im Extremfall als Schock äußern (Sennekamp et al. 2002). Laut Angabe des Paul-Ehrlich-Institutes wurde für schwere lebensbedrohliche Reaktionen zwischen 1991 und 2000 eine Inzidenz von 0,002 bis 0,008 Prozent bei nichtmodifizierten und 0,005 bis 0,01 Prozent bei modifizierten Semi-Depot-Extrakten errechnet (Lüderitz-Püchel et al. 2001). Bei Untersuchung der dokumentierten schweren Reaktionen konnte erkannt werden, dass ein Teil der Ereignisse aufgrund von Risikofaktoren vorhersehbar und durch Sorgfalt und Prophylaxe in Art und Ausmaß teilweise vermeidbar gewesen wäre (Kleine-Tebbe et al. 2003). Solche schweren Reaktionen zeigen sich meist als asthambedingte starke Bronchialobstruktionen und seltener als anaphylaktischer Schock. Zur Minderung derartiger lokaler und systemischer Reaktionen bei gleichem Therapieerfolg kann eine Prämedikation mit nichtsedierenden Antihistaminika selten auch mit niedrig dosierten Kortikosteroiden verordnet werden (Reimers et al. 2000). Der Erfolg der Immuntherapie wird durch die Prämedikation wahrscheinlich nicht gemindert, eher sogar gesteigert (Müller et al. 2001). Des Weiteren sollte nach dem Auftreten von sehr großen Lokalreaktionen zur Fortführung der Behandlung die zuletzt gut tolerierte Dosis appliziert werden und vorerst keine Steigerung erfolgen. Allerdings korreliert die Größe der Lokalreaktion nicht mit dem Risiko systemischer Reaktionen. Systemische Reaktionen sind sofort zu behandeln, die Dosis der Immuntherapie sollte mindestens zwei bis drei Stufen reduziert werden, die erneute Steigerung kann in kleineren Schritten erfolgen. Die vom Hersteller empfohlene Erhaltungsdosis muß nicht in jedem Fall erreicht werden, entscheidend für den Erfolg der Therapie ist die verabreichte Gesamtalergenmenge (Sennekamp et al. 2002).

### **Applikationsmechanismen**

Die SIT kann sowohl präseasonal als auch perennial durchgeführt werden. Bei der erstgenannten Möglichkeit wird während der Pollensaison die Behandlung pausiert, danach wird wieder mit der niedrigsten Dosierung begonnen und die Dosis entsprechend des Therapieschemas gesteigert. Bei der ganzjährigen Behandlung wird während der Pollensaison die Dosis lediglich reduziert (Sennekamp et al. 2002). Bei deutlichem Erfolg erstreckt sich die Therapie über drei bis fünf Jahre.

Bereits um 1900 entstand die Idee, Allergene in Extrakten oral zu verabreichen, aber erst seit den 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts beschäftigt sich die Wissenschaft wieder zunehmend mit anderen Applikationsformen als der subkutanen, vorrangig der sublingualen

bzw. oralen Immuntherapie. Zum einen sollen hierbei die unerwünschten systemischen Reaktionen der subkutanen Allergeninjektion vermindert (Fuchs und Klimek 2000), zum anderen aber auch die Invasivität in Form der Spritzen umgangen werden, so dass die Immuntherapie einfacher zu händeln sei und einem größeren Patientenkollektiv zur Verfügung stünde. Die Allergenapplikation findet allerdings hierbei meist täglich statt, so dass eine gute Compliance dringende Voraussetzung ist.

#### Orale Immuntherapie

Die orale Immuntherapie ist seit Beginn des 20. Jahrhunderts bekannt (Back 1927). Grundlage für die lokale Immuntherapie ist die Annahme, dass das Schleimhaut-Immunsystem (gastrointestinale, orale und nasobronchiale Mukosa) als Einheit fungiert, d.h. die Stimulation des Systems an der Mukosa eines Organs kann eine spezifische Immunglobulinantwort an entfernten Schleimhäuten bewirken (Taudorf 1992). Eine orale Therapie hat demzufolge möglicherweise einen günstigen Einfluß auf die nasobronchiale Mukosa. Vom Ärzteverband Deutscher Allergologen (ÄDA) wird die lokale Therapie noch nicht empfohlen, da noch nicht für alle Allergene ausreichende Erfahrungen vorliegen, die Langzeitwirkungen noch ungeklärt sind, die optimalen Dosen noch nicht bekannt sind und die Kosten für die Allergenextrakte erheblich höher sind (Sennekamp et al. 2002).

Die orale Therapie zeigt eine gute Verträglichkeit. Nebenwirkungen wurden bei ca. 10% der Patienten beobachtet, wobei die gastrointestinalen Beschwerden, wie Abdominalschmerzen, Diarrhöe und Erbrechen am häufigsten waren (Fischöder et al. 1982). Rhinokonjunktivitisches Beschwerden oder unerwünschte Reaktionen an der Bronchialschleimhaut sind möglich (Giovane et al. 1994), auch kann sich ein vorbestehendes atopisches Ekzem verschlechtern. Allerdings wurden lebensbedrohliche Anaphylaxien bisher nicht beobachtet. Die Allergenkonzentration muss bei der oralen Immuntherapie 100-1000mal höher sein als für die konventionelle subkutane Therapie. Die Wirksamkeit ist bislang nur für ein kleines Allergenspektrum beschrieben, v.a. Birken-, Beifuß-, Maispollen und Hausstaubmilben (Passalacqua und Canonica 1995).

#### Sublinguale Immuntherapie

Die sublinguale Immuntherapie (SLIT) ist jünger als die orale, bei der das Allergen direkt geschluckt wird. Es gibt zwei Arten der SLIT, eine ausschließlich sublinguale, bei der das Allergen eine bestimmte Zeit im Mund behalten und dann ausgespuckt wird und eine kombiniert sublingual-orale, bei der das Allergen nach der entsprechenden Verweildauer im Mund heruntergeschluckt wird. Der Wirkmechanismus der SLIT ist bisher nicht geklärt, es wird eine Stimulation des lokalen Schleimhaut-Systems aber auch die Induktion einer so genannten

low-zone-tolerance diskutiert (Malling 1996). Im Gegensatz zur subkutanen Applikationsform sind hier bisher nur sehr diskrete immunologische Veränderungen nachgewiesen worden, wobei die klinische Bedeutung noch unklar ist (Lima et al. 2002).

Die Mundschleimhaut scheint sich für die Toleranzentwicklung aus dem Grund gut zu eignen, da sie wenige Mastzellen und B-Lymphozyten und keine Eosinophilen enthält. Im Gegensatz dazu finden sich hier viele orale Langerhanszellen (hochspezialisierte dendritische Zellen), die in erheblichem Maße die Allergene der sublingual applizierten Extrakte einfangen und den T-Zellen präsentieren können. Die aktivierten T-regulatorischen Zellen verursachen Zytokinveränderungen, die wiederum eher IgG- und IgA-Reaktionen hervorrufen als eine allergische IgE-Reaktion (Bieber 2005). In einigen Studien konnte die Wirksamkeit bereits in Form von Symptomreduktion und reduziertem Medikamentenverbrauch gezeigt werden (Frew und Smith 2001). Allerdings liegen noch keine ausreichenden Daten zur optimalen Dosis und Behandlungsdauer, zur Wirkungsweise, zur Dauer des Therapieerfolges und zur präventiven Wirksamkeit vor (Frew und Smith 2001).

Die Sicherheit der sublingualen Immuntherapie ist ebenfalls in mehreren Studien untersucht worden. Es zeigt sich, dass lokale, von selbst wieder abklingende Reaktionen ziemlich häufig, systemische Reaktionen aber eher selten auftreten (Gidaro et al. 2005). Bei sachgerechter Anwendung scheint die SLIT im Vergleich zur SCIT ähnlich effektiv bei geringerer Häufigkeit von Nebenwirkungen zu sein. Für den Therapieerfolg ist eine adäquate Dosierung entscheidend, die sublinguale Immuntherapie erfordert eine 50-375fach höhere Dosis als die Injektion (Andre 2001). In Deutschland und anderen europäischen Ländern werden derzeit multizentrische, kontrollierte Studien durchgeführt. Ferner sind placebokontrollierte Vergleichsuntersuchungen mit der subkutanen SIT oder einer Pharmakotherapie von großem Interesse (Kleine-Tebbe et al. 2003). Die SLIT wäre dann besonders für Kinder zu empfehlen, aber auch für Erwachsene mit allergischer Rhinokonjunktivitis sowie mildem Asthma. Auch Patienten, die eine subkutane Immuntherapie wegen Nebenwirkungen abbrechen mussten oder aus beruflich-ökonomischen Gründen keine Zeit für die längerfristige Behandlung beim Arzt haben, können von der SLIT profitieren.

#### Nasale Immuntherapie

Die nasale Immuntherapie induziert wahrscheinlich genau wie die orale und die sublinguale Immuntherapie eine lokale Schleimhautimmunität (Passalacqua und Canonica 1996). Obwohl die nasale Hyperreaktivität hierbei insgesamt vermindert wird, zeigen sich Nebenwirkungen in Form genau der Symptome, die durch die Therapie verhindert werden sollen, in geringerem Ausmaß perennial.



## **Prognose**

Die spezifische Immuntherapie gilt als allgemein anerkanntes und von der WHO empfohlenes Therapieverfahren. V.a. bei Kindern und Jugendlichen und bei neu entstandenen Allergien ist die SIT sehr erfolgreich. Die besten Ergebnisse mit einer über 90%igen Erfolgsquote werden bei Hymenopterenallergien (Bienen- und Wespengiftallergien) erreicht (Sennekamp et al. 2002). Ebenfalls günstig ist die SIT in einem frühen Erkrankungsstadium, da noch keine Chronifizierung der Erkrankung mit entsprechenden Organveränderungen stattgefunden hat und ein Etagenwechsel von der Rhinitis zum Asthma sowie Neusensibilisierungen verhindert werden können (Sennekamp et al. 2002). Allerdings sollte bei der allergischen Rhinokonjunktivitis erst nach der zweiten symptomatischen Pollensaison mit der Therapie begonnen werden, da dadurch die klinische Relevanz der Sensibilisierung bestätigt ist. Unter der Therapie kommt es meist zu einer Normalisierung der Schleimhaut-Hyperreagibilität. Als Folge einer wirksamen Therapie zeigen sich ein geringerer Medikamentenverbrauch und ein Zugewinn an Lebensqualität für den Patienten (Sennekamp et al. 2002).

Es gibt keine Tests oder Laborparameter zur Vorhersage oder zur Kontrolle des Therapieerfolges, abgesehen vom Verlauf der klinischen Beschwerden und dem Medikamentenverbrauch. Ein günstiger Verlauf bedeutet nicht nur die Regression der Krankheit, wie ein positiver Einfluss auf die Bronchialschleimhaut und die Verhinderung eines Asthma bronchiale, sondern auch die Verhinderung der Entstehung neuer allergischer Sensibilisierungen (Pajno et al. 2001). Nach einigen Jahren der Beschwerdelinderung können erneut allergische Symptome auftreten, eine wiederholte SIT ist sinnvoll (Kleine-Tebbe et al. 2003). Ambulant werden vorwiegend Semi-Depot-Lösungen verwendet. Die entsprechende Injektionsdosis wird streng subkutan streckseitig, handbreit oberhalb des Olecranon injiziert (Kleine-Tebbe et al. 2000). Nach der Injektion muss der Patient mindestens 30 Minuten, bei Applikation von Hymenopterengiften sogar 60 Minuten unter ärztlicher Kontrolle bleiben, starke körperliche Belastung sollte am Tag der Injektion vermieden werden. Die SIT darf nur von allergologisch erfahrenen Ärzten durchgeführt werden, die eine Notfallbehandlung beim Auftreten starker Nebenwirkungen gewährleisten können.

### **1.8.3 Weitere Therapieoptionen**

#### **Leukotrienantagonisten**

In letzter Zeit werden zunehmend Pharmaka gesucht, die in andere Wirkmechanismen der allergischen Reaktion eingreifen, z.B. Leukotrienantagonisten. Bei einer allergischen Entzündung setzen Makrophagen, Mastzellen und Eosinophile Arachidonsäure frei, die daraus ent-

stehenden Leukotriene erhöhen die Gefäßpermeabilität und die Schleimhautsekretion, verursachen nasale Obstruktion und Bronchokonstriktion, stören die Funktion des Flimmerepithels und locken weitere Eosinophile an. Die Leukotriene sind sozusagen der „gemeinsame Nenner“ bei den verschiedenen allergischen Manifestationen. Durch orale, systemisch wirkende Leukotrienantagonisten kann eine einheitliche an verschiedenen Zielorten angreifende Therapie ermöglicht werden. Der Wirkstoff Zileuton unterdrückt die Synthese von Cysteinyl-Leukotrienen, ist aber bisher in Deutschland noch nicht zugelassen. Montelukast wirkt als Rezeptorantagonist für Cysteinyl-Leukotriene am Wirkort. Es darf in Deutschland zur Behandlung von leichtem bis mittelschweren allergischem Asthma bronchiale und bei Analgetikaintoleranz verordnet werden (Grevers und Röcken 2001). Eine Kombination mit Antihistaminika ist wegen additiver Wirkung sinnvoll.

### **Anti-IgE-Antikörper**

Eine andere Möglichkeit zur Beeinflussung der allergischen Reaktion findet sich in der Therapie mit Anti-IgE-Antikörpern. Dieses Therapieprinzip ist mit der Entwicklung des „humanisierten“ monoklonalen Antikörpers rhu-MAb-E25, Omalizumab, jetzt auch für den klinischen Einsatz am Menschen verfügbar. Der IgE-Antikörper greift auf einer sehr frühen Stufe der Allergiekaskade ein. Durch Bindung von frei zirkulierendem wie auch zellständigem IgE werden die hochaffinen Fc<sub>ε</sub>RI-Rezeptoren auf Mastzellen und Basophilen, aber auch die niedrig affinen Rezeptoren auf anderen allergischen Zellen blockiert. Daher ist die Art der Allergie nicht von Bedeutung, eine diagnostische Bestimmung des auslösenden Allergens ist nicht notwendig. Die IgE-E25-Immunkomplexe sind nicht anaphylaktogen und rufen keine Komplementaktivierung hervor, sie sind relativ klein und werden renal ausgeschieden.

Hauptindikationsgebiete sind das allergische Asthma bronchiale und die allergische Rhinokonjunktivitis, Studien an Patienten mit Neurodermitis laufen derzeit noch. Besonders geeignet ist diese Form der Therapie für schwer kranke Patienten oder solche, die unter einer Kortisontherapie starke Nebenwirkungen aufweisen, auch bei schweren Berufsallergien und bei Patienten, die ein polyvalentes Allergenspektrum zeigen oder bei solchen, bei denen eine spezifische Immuntherapie erfolglos verlaufen ist, sollte die Anti-IgE-Antikörpertherapie zum Einsatz kommen. Weniger geeignet ist Omalizumab für Allergiker mit sehr hohen IgE-Ausgangswerten, da die zu injizierende Anti-IgE-Konzentration zu hoch dosiert werden müsste. Der Antikörper wird ein bis zweimal im Monat subkutan verabreicht, zur Therapie der allergischen Rhinokonjunktivitis nur während der Pollensaison, Asthmapatienten bekommen ihn perennial (Zielen 2000). Eine Kombination von spezifischer Immuntherapie und der Anti-

IgE-Antikörpertherapie könnte Nebenwirkungen verringern und einen noch besseren Therapieeffekt erzielen (Kühr et al. 2002).

## **1.9 Prävention**

Die Prävention kann in folgende drei Teile geteilt werden. Die Primärprävention dient der Vermeidung von Ursachen, hierzu gehören z.B. die Empfehlungen zum Stillen, zur Allergen-karenz und zu einer tabakrauchfreien Umgebung. Die Sekundärprävention bezieht sich auf eine frühzeitige Entdeckung und Therapie sowie das Verhindern des Wiedereintritts eines Krankheitsereignisses. Auf die Allergie bezogen heißt das, Risikogruppen sollen erkannt werden, und durch Allergenkarenz, Pharmakoprophylaxe oder Desensibilisierung soll die Manifestation einer Zweiterkrankung verhindert werden. Zur Tertiärprävention gehört die Verhütung bzw. Verzögerung der Verschlimmerung einer etablierten Erkrankung, hierzu zählen ebenfalls die Allergenprävention, Desensibilisierungen, Pharmakotherapie sowie Schulungen, Psychotherapie und Rehabilitationsaufenthalte (Schäfer 2002).

Bezogen auf die empfohlene Allergenkarenz muss zwischen einem Allergie-Risiko und einer manifesten Erkrankung unterschieden werden (Renz 2001). Ein bereits sensibilisierter Patient sollte selbstverständlich die entsprechenden Allergene meiden. In der Prävention ist die Allergenkarenz allerdings mittlerweile umstritten. Allergene wie Pollen, Nahrungsmittel, Hausstaubmilben oder Tierhaare sind, wenn sie als solche erkannt worden sind, für das Immunsystem harmlose Umweltantigene. Die Entwicklung einer solchen Toleranz ist ein aktives immunologisches Ereignis, das nur bei Antigenkontakt stattfinden kann (Renz 2001). Es ist bekannt, dass dieses Stadium der Toleranz umso leichter erzielt werden kann, je höher der Antigenkontakt ist und dass Allergene gerade dann zu einer Allergie führen, wenn besonders niedriger Kontakt besteht (Renz 2001). Es bleibt demzufolge weiterhin ungeklärt, auf welchem Wege die Antigene einerseits zur Toleranzinduktion andererseits zur Sensibilisierung führen.

## **1.10 Forschungsansatz**

Die spezifische Immuntherapie ist die einzige kausale Therapie der Allergien vom Soforttyp. Da der immunbiologische Wirkmechanismus noch nicht vollständig geklärt ist, sind hier viele Ansatzpunkte für die Forschung zu finden. Es wird im Allgemeinen von einer Wirkung auf die Antigenpräsentierenden Zellen (APC) und die T-Zellen ausgegangen. Die Rolle der B-Lymphozyten bei der spezifischen Immuntherapie ist aber noch immer unklar und soll deswegen in dieser Arbeit näher untersucht werden.

## 2 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob die Immunglobulinproduktion von B-Lymphozyten aus dem Blut von Allergikern unter Sublingualer Immuntherapie durch die Stimulation mit Interleukinen in vitro beeinflussbar ist.

Zu diesem Zweck wurden die B-Zellen aus dem Blut von Kindern mit einer Allergie auf Frühblüher, Gräser oder Hausstaubmilben in einem 14tägigen in-vitro-Kultursystem untersucht.

Die konkreten Ziele waren hierbei, Folgendes zu analysieren:

- Einfluss der Interleukine IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13 und deren Kombinationen auf die Expression von IgA, IgG und IgM
- Vergleich der relativen Immunglobulinproduktion mit Kontrollansätzen
- Vergleich der relativen Immunglobulinproduktion bei verschiedenen Interleukinkombinationen
- Vergleich der relativen Immunglobulinproduktion mit Ergebnissen früherer Untersuchungen von unbehandelten Allergikern
- Darstellung der Ergebnisse hinsichtlich der verschiedenen Allergene Frühblüher, Gräser und Hausstaubmilben
- Darstellung der Ergebnisse hinsichtlich der verschiedenen Immunglobuline IgA, IgG und IgM
- Kritische Einschätzung des verwendeten B-Zell-Kultursystems

## 3 Patienten, Material und Methoden

### 3.1 Patientenauswahl und Therapieschema

Die in dieser Arbeit verwendeten Blutproben stammen von Kindern aus der Kinderklinik des Robert-Koch-Krankenhauses Apolda, denen zu diagnostischen Zwecken Blut abgenommen wurde. Bei 75 Kindern erfolgten die Laboruntersuchungen für diese Arbeit während der Behandlung mit einer sublingualen Immuntherapie, wobei die Patienten im Durchschnitt bereits 12 Monate behandelt wurden. 36 Kinder zeigten eine Allergie gegen Gräserpollen, 17 gegen Pollen von Frühblühern und 22 gegen Hausstaubmilben. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Blutentnahme war 12,5 Jahre.

Es wurden nur solche Patienten in die Studie aufgenommen, die im RAST eine CAP-Klasse zwischen 3 und 6 aufwiesen sowie seit mindestens zwei Jahren Symptome der Allergie zeigten. Ausschlusskriterien waren Mehrfachallergien, chronisches Asthma bronchiale mit pathologischen Veränderungen im Bereich des Respirationstraktes, eine begonnene oder unterbrochene spezifische Immuntherapie und eine akute Erkrankung zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Ein schriftliches Einverständnis der Eltern zur Durchführung der Studie lag selbstverständlich vor.

Die Patienten wurden mit Pangramin SLIT<sup>®</sup> nach unten stehendem Therapieschema behandelt. Der Allergengehalt ist biologisch standardisiert und in STU/ml (Spezifische Behandlungseinheit) angegeben:

- Flasche 1 (0,5 STU/ml Allergen)
- Flasche 2 (5 STU/ml Allergen )
- Flasche 3 (50 STU/ml Allergen)
- Flasche 4 (500 STU/ml Allergen)

Tab. 2: Dosierungsschema von Pangramin SLIT<sup>®</sup> für Flasche 1-4:

Tag	Dosierung
1. Tag	1 Tropfen
2. Tag	2 Tropfen
3. Tag	4 Tropfen
4. Tag	6 Tropfen
5. Tag	8 Tropfen
6. Tag	10 Tropfen
7. Tag	10 Tropfen

Von der vierten Flasche müssen zusätzlich an den Tagen 9, 11, 14, 16, 18 und 21 je 10 Tropfen eingenommen werden. Die Erhaltungsdosis von 10 Tropfen aus Flasche 4 soll dreimal wöchentlich eingenommen und ganzjährig fortgesetzt werden, insgesamt über drei Jahre. Die Tropfen müssen jeweils zwei Minuten unter der Zunge behalten und anschließend geschluckt werden. Da die Dosis während der Pollensaison nicht gesteigert werden sollte, muss die Anfangsbehandlung einer Pollenallergie vor Saisonbeginn abgeschlossen sein. Wird die Behandlung unterbrochen, gilt folgendes Schema für die Therapieweiterführung:

Unterbrechung bis zu 1 Woche: Reduktion um 1 Stufe

Unterbrechung von 1-2 Wochen: Reduktion um 2 Stufen

Unterbrechung von 2-3 Wochen: Reduktion um 3 Stufen

Unterbrechung von 3-4 Wochen: Reduktion um 4 Stufen

Unterbrechung von mehr als 4 Wochen: Neubeginn der Behandlung.

## **3.2 Material**

### **3.2.1 Arbeitsbedingungen**

Die Aufbereitung der Blutproben einschließlich der B-Zell-Isolierung und dem Ansetzen der B-Zell-Kultur wurde unter sterilen Bedingungen an einer Arbeitsbank mit laminarem Gegenstrom durchgeführt. Dazu wurden sterile Einmalprodukte oder im Autoklaven behandelte Arbeitsgeräte genutzt. Zu verwendende Lösungen wurden unter sterilen Bedingungen angesetzt, autoklaviert oder vor Gebrauch steril filtriert.

### **3.2.2 Zelllinien**

Für das CD40- System wurden Ltk-Zellen der Maus kultiviert, die mit einem CDw32 (Fc $\gamma$ RII) Rezeptor transfiziert worden sind, der CD40-IgG bindet. Zur Bildung des erforderlichen monoklonalen Anti-human-CD40-IgG-Antikörpers (G28-5) wurde eine G28-5 Zelllinie verwendet, die freundlicherweise von Peter Lane vom Institut für Immunologie Basel und von Christian Heuser von der Novartis GmbH zur Verfügung gestellt wurde.

In 5ml RPMI/FKS wurden die Ltk-Zellen in Gewebekulturflaschen unter Standardbedingungen von 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und feuchter Atmosphäre kultiviert. Nach Zugabe von 1 ml Trypsin und fünfminütiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> konnte der Überstand abgenommen werden, das Trypsin wurde mit 10% RPMI/FKS inaktiviert. Die so gewonnenen Ltk-Zellen wurden entweder für das CD40-System verwendet oder in 1ml Einfriermedium bei -70°C eingefroren und nach 24 Stunden in flüssigen Stickstoff von -180°C transferiert.

### 3.2.3 Chemikalien

Tab. 3: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
AAS (antimycotic antibiotic solution)	Sigma
Beta-Mercaptoethanol	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
EDTA 8,0	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
Essigsäure	Serva
Ethanol	Nordbrand
Ficoll-Isopaque (Lymphoprep)	Nycomed
FKS (inaktiviertes fetales Kälberserum)	Greiner
Glutamin	Ferak Berlin
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma
Natriumacetat	Sigma
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat NaHCO <sub>3</sub> )	Polskie Odczynniki Chemiczne, Gliwice
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma
Paraformaldehyd	Sigma
Phosphatasesubstrat-Tabletten	Sigma
RPMI 1640	GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe
Standard-Human-Serum	Behring
Trypsin	Sigma
Tween	Fluka

### 3.2.4 Puffer

Tab. 4: Verwendete Puffer

Puffer	Herstellung
Beschichtungspuffer für ELISA-Platten	8 ml 0,2 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 17 ml 0,2 M NaHCO <sub>3</sub> 75 ml Aqua destillata
Blockinglösung	5% FKS in PBS
Einfriermedium	10 % DMSO 40 % inaktiviertes FKS 50 % RPMI
Färbelösung	1ml Beschichtungspuffer 9ml Aquadestillata 1 Tablette Phosphatasesubstrat
FKS/RPMI-Kulturmedium	90 ml RPMI 10 ml inaktiviertes FKS 1 ml 100 x Glutamin 100 µl 1000 x β-Mercaptoethanol (10 ml NaCl + 30µl β-Mercaptoethanol) 1 ml AAS (100x)
Paraformaldehydlösung (PFA 0,05%)	80 ml 1 x PBS 1 ml 4 % Paraformaldehydlösung in PBS
PBS 10x (Phosphat buffert saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)	87,66g NaCl 1,632 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5,66 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (oder 31,48 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O)
PBS/FKS	1x PBS 50mM EDTA 8,0 0,01% Natriumazetat 1% FKS inaktiviert
PBS/Tween	500ml 1x PBS 20 Tropfen Tween



### 3.2.5 Weitere Materialien

Tab. 5: Weitere verwendete Materialien

Materialien	Hersteller
Dreiwegehahn (steril)	Becton Dickinson
FACScan Durchflusszytometer und entsprechende Software	Becton Dickinson
Flachboden-Gewebekulturplatte	Falcon
Injektionsspritze (steril)	B.Braun Melsungen AG
Kanüle (steril)	24G Microlance Becton Dickenson
Lymphozytenseparationsröhrchen	Greiner
MACS (Magnetic activated cell sorter)	Miltenyi Biotech GmbH
MACS-Separationssäule, Typ A, Kapazität $3 \times 10^7$ Zellen	Miltenyi Biotech GmbH
Neubauer-Zählkammer	Feinoptik Bad Blankenburg
Pasteurpipette	Greiner
Polysorp-Platte (96 Vertiefungen)	Nunc
SA-POD	DAKO
Spitz- und Rundbodenröhrchen	Greiner

### 3.2.6 Allergene und Antikörper

Tab. 6: Verwendete Allergene und Antikörper

Allergene und Antikörper	Hersteller
Phleum-gesamt-Allergen	Abelló
Hasel-Birke-Allergen	Abelló
Dermatophagoides pteronysinus-Allergen	Abelló
anti-CD40-Antikörper	ATTC (Hersteller der Zelllinie; der Antikörper wurde im Labor der Klinischen Immunologie Jena hergestellt)
anti-human IgA	Jackson
anti-CD19 magnetische Microbeads	Miltenyi Biotech GmbH
Rabbit F(ab') <sub>2</sub> -anti-human-IgG Kaninchen-F(ab') <sub>2</sub> -anti-human-IgG	Dako
anti-human-IgM	Dako
Goat-anti human-Serum IgA Alkaline Phosphatase	Jackson
mGoat-F(ab') <sub>2</sub> Ig G Alkaline Phosphatase	Caltag
mGoat-F(ab') <sub>2</sub> Ig M Alkaline Phosphatase	Caltag

### 3.3 Methoden

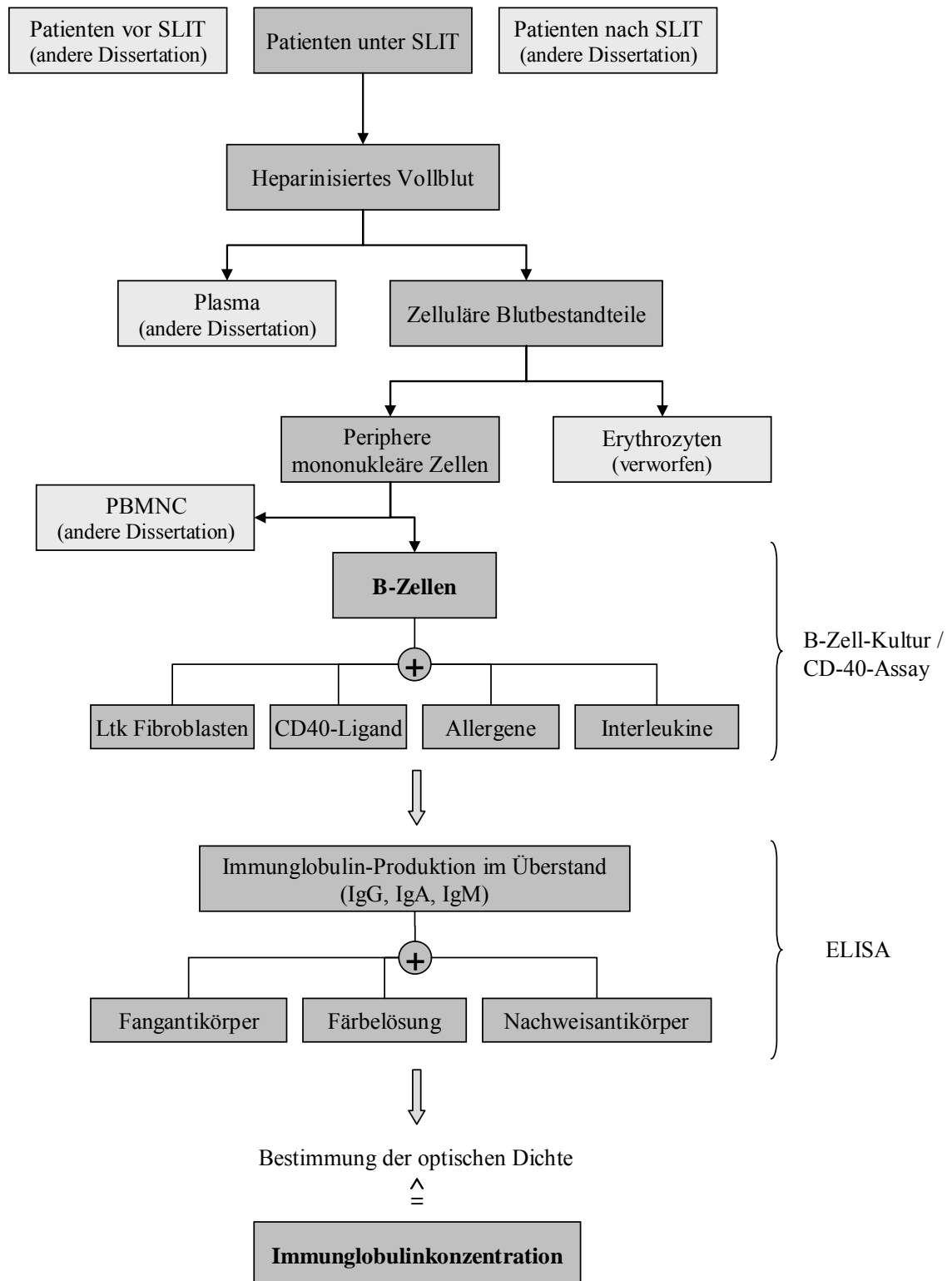


Abb. 3: Versuchsstruktur – Ablauf der experimentellen Untersuchungen

Der komplette Versuchsablauf ist in Abb. 3 schematisch abgebildet. Im Folgenden sollen die einzelnen Schritte der Untersuchungen detailliert dargelegt werden.

### **3.3.1 Plasmaisolation**

Das peripher venös abgenommene heparinisierte Vollblut wurde bei 2160 U/min 10 Minuten zentrifugiert. Der abpipettierte Überstand wurde nochmals 30 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert. Das so gewonnene Plasma konnte bei -70°C für spätere Nutzung eingefroren werden.

### **3.3.2 Ficoll – Dichtegradient (Lymphozytenseparation)**

Als erstes wurden Lymphozytenseparationsröhrchen vorbereitet, in dem 3ml Ficoll-Isoplaque (Lymphoprep) hinein pipettiert und die Röhrchen anschließend bei 2160 U/min 1 Minute zentrifugiert wurden, so dass sich das Isoplaque unterhalb der Filterscheibe befand. Die vom Plasma getrennten zellulären Blutbestandteile wurden mit RPMI 1640 aufgefüllt, resuspendiert und je 6ml davon mit Hilfe einer Pasteurpipette in die Lymphozytenseparationsröhrchen gegeben. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 2160 U/min fand sich im Röhrchen folgende Schichtung von oben nach unten:

Überstand aus RPMI 1640

Weißer Ring, den peripheren mononukleären Zellen entsprechend

Ficoll-Isoplaque

Membran

Gelbrote Flüssigkeit, bestehend aus Ficoll-Isoplaque und Erythrozyten.

Durch Abpipettieren des weißen Rings konnten die peripheren mononukleären Zellen von den Erythrozyten getrennt werden. Anschließend wurden die peripheren mononukleären Zellen dreimal in je 10ml RPMI 1640 gewaschen, d.h. sie wurden mit einer Pasteurpipette resuspendiert und jeweils 10 Minuten bei 2160 U/min zentrifugiert. In einer Neubauer-Zählkammer wurden sie nachfolgend gezählt, wobei 95µl Essigsäure und 5 µl Zellsuspension in einem Rundbodenröhrchen gemischt und mittels Objektträger und Deckglas unter einem Mikroskop gezählt wurden.

### **3.3.3 B-Zell-Separation mittels MACS (Magnetic Activated Cell Separator)**

Mit Hilfe eines magnetischen Feldes konnten die B-Zellen von den restlichen peripheren mononukleären Zellen getrennt werden. Dafür wurden 2µl anti-CD19 magnetische Microbeads und 8µl PBS/FKS pro eine Million Zellen gegeben, gut gemischt und 15 Minuten bei 4°C inkubiert.

Das MACS-Gerät wurde desinfiziert und anschließend unter den Abzug, d.h. auf die Arbeitsbank mit laminarem Gegenstrom gestellt. Die MACS-Separationssäule wurde am unteren Ende mit einem Dreiwegehahn verbunden und dann im Magnetfeld des MACS angebracht. Um die Luft vollständig aus der Separationssäule zu entfernen, wurden ca. 20ml eisgekühlter 70%iger Alkohol mit Hilfe einer sterilen Spritze über den Dreiwegehahn in die Säule gepresst. Auf Grund einer geringen Oberflächenspannung erzielt der Alkohol eine gute Benetzung der Oberfläche im Metallgitternetz der Säule. Um den Alkohol wieder zu entfernen, wurde anschließend PBS/FKS auf die Säule gegeben und durch den seitlichen Ausgang des Dreiwegehahns ablaufen lassen. Dabei musste sichergestellt sein, dass der Flüssigkeitsspiegel nie unter das obere Ende des Metallgitternetzes absank, um keine erneute Luft in das Röhrchen zu lassen. Zur gründlichen Reinigung wurde weiterhin mittels einer neuen 20ml Injektionsspritze 15 ml PBS/FKS über den seitlichen Eingang des Dreiwegehahns nach oben gepresst und nach unten wieder ablaufen gelassen. Die restlichen 5ml PBS/FKS verblieben in der Spritze am Dreiwegehahn. Am unteren Ende des Dreiwegehahns wurde jetzt eine sterile Kanüle befestigt.

Zur Zelltrennung wurde die Zellsuspension aus den peripheren mononukleären Zellen auf die Trennsäule gegeben und diese mit mindestens 5ml PBS/FKS gespült. Die nicht magnetisch markierten Zellen (PBMNC, Peripheral blood mononuclear cell) konnten unten aus der Säule heraustropfen und in einem Spitzbodenröhrchen zur weiteren Verarbeitung aufgefangen werden. Die Kanüle wurde entfernt und die Säule mit Dreiwegehahn aus dem Gerät entnommen. Außerhalb des magnetischen Feldes des MACS wurde die Säule mit PBS/FKS und anschließend mehrmals mit Luft gespült, so dass die B-Zellen aus dem Metallgitternetz entfernt und ebenfalls in einem Spitzbodenröhrchen aufgefangen werden konnten. Sowohl die B- als auch die T-Zellen wurden anschließend gewaschen, in 10%igem RPMI/FKS Kulturmedium aufgenommen und in einer Neubauer Zählkammer gezählt.

#### **3.3.4 Bestimmung des Anreicherungsgrades der B-Zellen mittels FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter)**

Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse konnte der Anreicherungsgrad der B-Zellen nach der Zellseparation bestimmt werden. Je 200µl aus den Röhrchen mit den magnetisch markierten B-Zellen und den peripheren mononukleären Zellen wurden mit 5µl anti-CD3-FITC, anti-CD14-PerCP und anti-CD19-PE 20 Minuten im Dunklen bei 4°C inkubiert und anschließend in kaltem 2%igem RPMI/FKS gewaschen. Die Messung und Auswertung erfolgte an einem FACScan Durchflusszytometer mit der entsprechenden CellQuest Software.

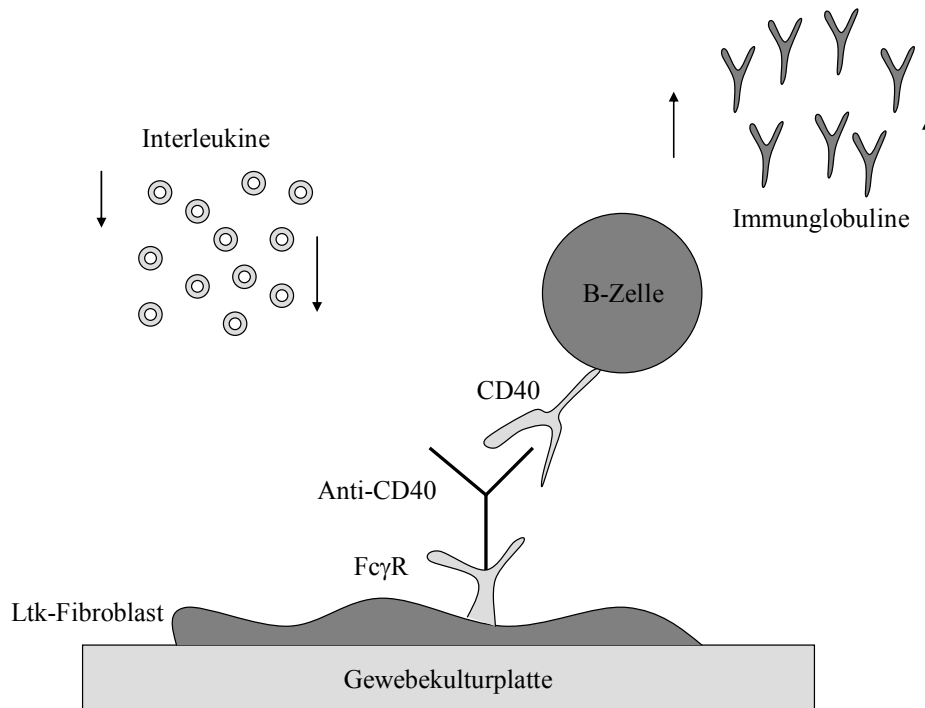


Abb. 4: Immunglobulinproduktion nach Stimulation der B-Zellen mit Interleukinen in Ko-Kultur mit Ltk-Fibroblasten und Anti-CD40

### 3.3.5 B-Zell-Kultur / CD40-Assay

Zur Herstellung der B-Zell-Kulturen wurden Flachboden-Gewebekulturplatten mit 6 x 8 Vertiefungen, so genannte wells verwendet. Alle notwendigen Arbeitsschritte wurden steril durchgeführt. Abb. 4 zeigt schematisch den Aufbau des CD40-Assays. In die erste und letzte Reihe der Kulturplatten wurde nur RPMI gegeben, um Fehler durch Verdunstung zu vermeiden. Für jeden Patienten wurde ein Gemisch aus 1500µg FKS/AAS mit 600.000 Ltk-Zellen, 600.000 B-Zellen und 30µg monoklonalem CD40-IgG (G28-5) hergestellt.

Die Ltk-Zellen sind transfizierte Mäusefibroblasten, die mittels des exprimierten FcγRII-Rezeptors den zugegebenen Anti-Human-CD40-IgG-Antikörper binden. Sie wachsen adhären auf den Gewebekulturplatten, wodurch der Kontakt zu dem CD40-Oberflächenmolekül der auf den Boden sinkenden B-Zellen intensiviert wird. Vor Einbringen in das Kultursystem wurden die Ltk-Zellen zur Proliferationshemmung am Institut für Nuklearmedizin der Friedrich-Schiller-Universität Jena mit 30Gy bestrahlt.

125µl von o.g. Gemisch aus B-Zellen, Ltk-Zellen und CD40-Antikörper wurden als Kontrolle in das 12. well gegeben. Nach Zugabe des entsprechenden Allergens erfolgte die Aufteilung

von je 125µl in well 1 bis 11. Als Allergene wurden 1µg/ml Phleum-gesamt-Allergen bzw. 2,5 µl/well Hasel-Birke-Allergen oder Dermatophagoides pteronyssinus-Allergen verwendet. Weiterhin wurden die Interleukine IL-4 (100U/ml), IL-6 (100U/ml), IL-10 (10ng/ml), IL-11 (10ng/ml), IL-13 (10ng/ml) bzw. deren Kombinationen der Kultur hinzugefügt (Tab. 7).

Tab. 7: Interleukinkombinationen

Well	Interleukin	Well	Interleukin
1	IL-4	7	IL-10 + IL-11
2	IL-6	8	IL-10 + IL-6
3	IL-10	9	IL-10 + IL-4
4	IL-11	10	IL-10 + IL-6 + IL-4
5	IL-13	11	Kontrolle ohne Interleukine
6	IL-10 + IL-13	12	Kontrolle ohne Interleukine und Allergen

Nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen bei 37°C, in 5%CO<sub>2</sub> und feuchter Atmosphäre wurden erneut 5000 Ltk-Zellen in 125µl Kulturmedium pro well dazugegeben. Nach weiteren 7 Tagen Inkubation wurden 300µl Überstand aus jedem well entnommen und bis zur Bestimmung der Immunglobuline bei -70°C eingefroren.

### 3.3.6 ELISA

Die Immunglobuline A, G und M können mittels Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) bestimmt werden. Die dazu notwendigen Polysorp-Platten wurden mit 50µl/well in Beschichtungspuffer verdünnten Fang-Antikörpern beschichtet. Folgende Konzentrationen der Antikörper wurden jeweils verwendet:

Anti-human-IgM 1:2000

Anti-human-IgA 1:4000

Kaninchen-F(ab')<sub>2</sub>-anti-human-IgG 1:500

Die drei Platten wurden über Nacht bei 4°C im Dunkeln belassen. Die Überstände in den wells konnten abgeschüttet und die Platten auf Zellstoff abgeklopft werden, da die Antikörper am Boden der wells anhafteten. Mit 100µl Blocking-Lösung/well wurden die Antikörper 2 Stunden bei 4°C geblockt und anschließend zweimal mit PBS/Tween mittels eines SLT-Plattenwaschers gewaschen. Die Kulturüberstände des CD40-Assay wurden währenddessen

bei Raumtemperatur aufgetaut, vorsichtig gemischt und zentrifugiert. Für die Platten der Immunglobuline A und G wurden jeweils 50µl/well 1:5 in FKS/RPMI verdünnte Kulturüberstände verwendet, für den IgM-Nachweis eine Verdünnung von 1:10. In die ersten beiden Reihen der Polysorp-Platten wurden Verdünnungsreihen aus Standard-Human-Serum nach vorgegebenem Muster pipettiert, aus deren optischer Dichte zur Auswertung Standardkurven zum Vergleich erstellt werden konnten. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler und anschließendem zweimaligen Waschen wurden 50µl/well Nachweisantikörper in folgenden Konzentrationen (Verdünnung in PBS/Tween) auf die Platten gegeben:

Anti-human-IgM	1:3000
Anti-human-IgA	1:2000
Anti-human-IgG	1:2000

Nach erneuter einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Taumelschüttler und zweimaligem Waschen wurde 50µl/well Färbelösung hinein pipettiert und die Platten abgedunkelt eine Stunde auf dem Taumelschüttler belassen.

Mit einem Dynatech Messfilter 1 konnte die optische Dichte bestimmt und mit den Standardkurven verglichen werden.

Um die gemessenen Immunglobulin-Werte der einzelnen Proben miteinander vergleichen zu können, wurden sie nach der Formel  $(x-xMW)/SD$   $\alpha$ -standardisiert.

x:	Messwert
xMW:	Mittelwert der 12 verschiedenen Interleukinansätze pro Probe
SD:	Standardabweichung dieser Werte

Mittels dieser standardisierten Werte konnte für jede Interleukin-Kombination der Mittelwert, der Meridian sowie die Standardabweichung berechnet werden.

Tab. 8: Verwendete Standard-Human-Seren

Standard	Charge	Gehalt	Hersteller
IgA-Standard-Human-Serum	A041023D (ab 4/1997: 041032A)	2,5g/l (ab 4/1997: 2,142g/l)	Behring
IgG-Standard-Human-Serum	A041023D	12,71g/l	Behring
IgM-Standard-Human-Serum	A041023D (ab 4/1997: 041032A)	1,09g/l (ab 4/1997: 0,805g/l)	Behring



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zellkulturen und Kontrollansätze

Es konnten Zellen von 75 Patienten unter durchschnittlich bereits ein Jahr applizierter sublingualer Immuntherapie kultiviert werden. Um sowohl IgA als auch IgG und IgM bestimmen zu können, wurden insgesamt 225 Primärkulturen mit je 12 Ansätzen angelegt. In ca. 21% der Ansätze konnten keine oder nur vereinzelt Immunglobuline nachgewiesen werden, es muss davon ausgegangen werden, dass die B-Zellen hier weitestgehend abgestorben sind. Von den insgesamt 225 Kulturen können demzufolge 177 ausgewertet werden. Von 36 Patienten mit einer Gräserpollenallergie kommen hinsichtlich der IgA-Bestimmung 28, hinsichtlich der IgG-Bestimmung 31 und bezüglich der IgM-Bestimmung 30 zur Auswertung. Von 17 Patienten mit einer Frühblüherallergie können 15 zur IgA- und 16 zur IgG-Bestimmung genutzt werden. Es sind 9 Ansätze zur IgM-Bestimmung nutzbar. Insgesamt konnte Blut von 22 Patienten mit einer Hausstaubmilbenallergie verwendet werden, wovon je 17 Ansätze zur Bestimmung von IgA und IgM und 14 zur IgG-Bestimmung ausgewertet werden.

In vergangenen Arbeiten mit den gleichen Ansätzen, die Blut von Allergikern vor Therapiebeginn untersuchten, wurden die niedrigsten bzw. gar keine Immunglobulinkonzentrationen in den B-Zell-Kulturen ohne Zusatz von Ltk-Fibroblasten und ohne CD40-Ligand gemessen (Niess 2001). Es kann davon ausgegangen werden, dass die B-Zellen dieser 14 tägigen Kontroll-Inkubation größtenteils abgestorben waren und somit abgestorbene Zellen nur eine geringe Menge Immunglobuline freisetzen (Niess 2001). Das bedeutet, dass die in den aktuellen Ansätzen gemessenen Immunglobulinkonzentrationen durch die in vitro Stimulierung produziert wurden (Niess 2001). Ebenfalls in früheren Arbeiten erfolgten zur Kontrolle der Haltbarkeit der Immunglobuline Inkubationen von definierten Immunglobulinkonzentrationen parallel zu den Zellkulturen, wobei nach 14 Tagen noch die gleiche Konzentration an Immunglobulinen nachweisbar war (Niess 2001). D.h. es kann davon ausgegangen werden, dass die gesamten während der Inkubation freigesetzten Immunglobuline gemessen wurden (Niess 2001).

Als Kontrollansatz zu den gemessenen Immunglobulinen dienen die Werte aus der Inkubation von B-Zellen, Ltk-Fibroblasten und Anti-Human-CD40-IgG (CD40-Ligand) ohne Zugabe von Interleukinen. Des Weiteren wurde untersucht, ob Immunglobuline durch Stimulation mittels eines Allergens ohne Hinzufügen von Interleukinen produziert werden.

Zwischen den einzelnen Blutproben traten große Variationen der Immunglobulinkonzentrationen auf. Im Gegensatz dazu zeigten sich innerhalb einer Blutprobe weitaus geringere

Schwankungen. Um die Werte untereinander vergleichen zu können, erfolgte eine  $\alpha$ -Standardisierung aller Messwerte. Es wurden Immunglobulinkonzentrationen von 1ng/ml bis fast 40 $\mu$ g/ml gemessen. Die standardisierten Werte beliefen sich auf -0,85 bis 0,93.

In der Tabelle 9 werden in den ersten zehn Ansätzen die Immunglobulinkonzentrationen dargestellt, die nach Stimulation durch verschiedene Interleukine und deren Kombinationen gemessen werden konnten. Der elfte Ansatz zeigt die Immunglobulinkonzentration, die nach alleinigem Zugabe eines Allergens zu den B-Zellen, den Ltk-Fibroblasten und dem CD40-Ligand ohne Stimulation durch Interleukine gemessen wurde. Er wird in allen Tabellen und Grafiken "B-Zellen + Allergen" benannt. Als Kontrolle dient die Ko-Inkubation von B-Zellen, Ltk-Fibroblasten und Antihuman-CD40-Ligand ohne Zusatz von Allergenen oder Interleukinen. Hier zeigt sich meist die niedrigste Immunglobulinkonzentration im Vergleich zu den anderen Ansätzen. Im Vergleich zu den Kontrollansätzen von den Patienten vor Therapiebeginn sind die relativen Immunglobulinkonzentrationen der Kontrollwerte der Patienten unter Therapie im Durchschnitt etwas höher. Es kann aber kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Für die Immunglobulinkonzentrationen der Patienten vor Therapiebeginn stehen aus früheren Arbeiten die Mittelwerte der relativen Immunglobulinproduktion zur Verfügung (Tab. 10) (Niess 2001).

Tab. 9: Mittelwerte der relativen Immunglobulinproduktion in 14tägigen B-Zell-Kulturen (CD40-Assay) unter Stimulation mit unterschiedlichen Interleukinen von Patienten unter SLIT.

Die Werte wurden  $\alpha$ -standardisiert.

<b>Frühblüherallergie</b>			
	<b>IgA</b>	<b>IgG</b>	<b>IgM</b>
IL-4	-0.04	0.18	-0.51
IL-10 + IL-4	0.03	0.01	-0.85
IL-6	-0.21	0.73	0.16
IL-10 + IL-6	0.30	-0.07	0.07
IL-10	-0.37	-0.22	-0.15
IL-10 + IL-6 + IL-4	-0.08	0.25	-0.37
IL-11	-0.03	-0.34	-0.07
IL-10 + IL-11	0.43	-0.02	0.79
IL-13	-0.10	-0.38	0.93
IL-10 + IL-13	0.20	0.11	0.39
B-Zellen + Allergen	0.11	-0.05	-0.01
Kontrolle	-0.25	-0.21	-0.39

<b>Gräserallergie</b>			
	<b>IgA</b>	<b>IgG</b>	<b>IgM</b>
IL-4	-0.11	-0.16	0.13
IL-10 + IL-4	-0.07	-0.20	0.07
IL-6	0.11	0.07	0.10
IL-10 + IL-6	-0.34	-0.23	0.00
IL-10	0.52	0.38	0.33
IL-10 + IL-6 + IL-4	-0.32	0.16	-0.09
IL-11	-0.09	0.06	-0.30
IL-10 + IL-11	0.07	0.01	0.31
IL-13	0.06	0.09	0.02
IL-10 + IL-13	0.11	0.05	-0.02
B-Zellen + Allergen	0.06	-0.12	-0.07
Kontrolle	-0.02	-0.11	-0.48

<b>Hausstaubmilbenallergie</b>			
	<b>IgA</b>	<b>IgG</b>	<b>IgM</b>
IL-4	0.09	0.06	-0.24
IL-10 + IL-4	-0.08	-0.05	-0.43
IL-6	-0.26	0.01	0.22
IL-10 + IL-6	-0.28	-0.47	0.54
IL-10	0.05	0.30	0.06
IL-10 + IL-6 + IL-4	0.01	0.17	0.08
IL-11	-0.24	-0.40	-0.36
IL-10 + IL-11	-0.35	0.04	0.17
IL-13	-0.02	-0.01	0.08
IL-10 + IL-13	0.44	0.46	-0.12
B-Zellen + Allergen	0.52	0.24	0.48
Kontrolle	0.13	-0.33	-0.49

Tab. 10: Mittelwerte der relativen Immunglobulinproduktion in 14tägigen B-Zell-Kulturen (CD40-Assay) unter Stimulation mit unterschiedlichen Interleukinen von Patienten vor Einleitung einer SLIT.  
Die Werte wurden  $\alpha$ -standardisiert.

<b>Frühblüherallergie</b>			
	<b>IgA</b>	<b>IgG</b>	<b>IgM</b>
IL-4	-0,09	-0,36	-0,36
IL-10 + IL-4	-0,12	-0,02	-0,24
IL-6	-0,18	0,25	0,44
IL-10 + IL-6	0,22	0,27	-0,13
IL-10	-0,14	-0,09	0,08
IL-10 + IL-6 + IL-4	-0,34	0,41	0,06
IL-11	0,13	-0,42	0,11
IL-10 + IL-11	-0,02	-0,02	-0,12
IL-13	-0,05	-0,05	0,22
IL-10 + IL-13	0,14	-0,12	0,04
B-Zellen + Allergen	-0,19	-0,02	-0,46
Kontrolle	-0,77	-0,82	-1,15

<b>Gräserallergie</b>			
	<b>IgA</b>	<b>IgG</b>	<b>IgM</b>
IL-4	-0,23	-0,19	-0,37
IL-10 + IL-4	-0,13	0,32	-0,17
IL-6	0,13	-0,25	0,12
IL-10 + IL-6	0,33	0,07	0,32
IL-10	0,27	0,33	0,33
IL-10 + IL-6 + IL-4	-0,25	0,19	-0,20
IL-11	-0,14	-0,01	-0,13
IL-10 + IL-11	-0,09	-0,05	0,19
IL-13	-0,02	0,10	0,01
IL-10 + IL-13	0,32	0,04	0,18
B-Zellen + Allergen	-0,22	-0,69	-0,79
Kontrolle	-1,06	-1,49	-0,80

<b>Hausstaubmilbenallergie</b>			
	<b>IgA</b>	<b>IgG</b>	<b>IgM</b>
IL-4	0,01	-0,31	-0,27
IL-10 + IL-4	-0,01	0,66	-0,12
IL-6	-0,17	0,03	0,12
IL-10 + IL-6	-0,28	0,1	0,02
IL-10	0,06	0	0,12
IL-10 + IL-6 + IL-4	-0,16	0,16	-0,13
IL-11	0,38	0,25	0,35
IL-10 + IL-11	-0,15	-0,38	-0,08
IL-13	0	-0,29	-0,32
IL-10 + IL-13	0,16	0,01	0,42
B-Zellen + Allergen	-0,31	-0,42	-0,69
Kontrolle	-0,79	-1,12	-0,65

## **4.2 Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher**

### **4.2.1 Vergleich der relativen Immunglobulinproduktion mit den Kontrollansätzen**

Die Zugabe von IL-4 zu den Kontrollansätzen mit Ltk-Fibroblasten, CD40-Ligand sowie B-Zellen von Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher bewirkt eine eher geringe relative Produktion von IgG und eine noch etwas niedrigere Produktion von IgA sowie eine Suppression der Produktion von IgM. Die Stimulation durch die alleinige Zugabe von IL-10 ist auch eher gering. IL-6 alleine bewirkt v.a. eine relativ hohe IgG-Produktion, die Produktion von IgA und IgM wird ebenfalls eher wenig beeinflusst. Die alleinige Zugabe von IL-11 erzielt ebenso eher niedrige relative Immunglobulinkonzentrationen, wie auch IL-13 bei der IgA- und IgG-Produktion. IgM wird durch alleinige Stimulation mit IL-13 deutlich mehr induziert (Abb. 5).

### **4.2.2 Vergleich der relativen Immunglobulinproduktion bei verschiedenen Interleukinkombinationen**

Obwohl einzeln auch eher supprimierend, bewirkt die Zugabe von IL-10 zu den anderen Interleukinen einen Anstieg der relativen IgA-Produktion. Im Vergleich der relativen IgA-Produktion durch IL-10 alleine und durch IL-10 + IL-11 zeigt sich eine signifikante Steigerung. Ebenso wird die relative IgG-Produktion durch die Zugabe von IL-10 zu IL-11 und IL-13 erhöht. Die relative IgM-Produktion kann nur durch Zugabe von IL-10 zu IL-11 angehoben werden. Hier zeigt sich wieder ein signifikanter Anstieg der Immunglobulinproduktion durch IL-10 und IL-11 im Gegensatz zur Stimulation durch IL-10 alleine. Im Gegensatz dazu wird die überdurchschnittlich hohe relative Immunglobulinproduktion durch IL-6 bei IgG und IL-13 bei IgM durch die Zugabe von IL-10 z.T. signifikant supprimiert. Ebenso werden die eher niedrigen relativen Immunglobulinkonzentrationen, die durch Stimulation durch IL-4 bei IgG und IgM sowie von IL-6 bei IgM erzielt werden, durch zusätzliche Gabe von IL-10 weiter erniedrigt.

Die Kombination der Interleukine IL-4, IL-6 und IL-10 bewirkt eine eher niedrige relative IgA- und IgM-Produktion, IgG zeigt einen relativ höheren Mittelwert. Die Immunglobulinkonzentration entspricht jeweils ungefähr dem Mittelwert, der durch alleinige Stimulation durch IL-4 hervorgerufen wird. Die Zugabe von IL-4 zur Kombination aus IL-6 + IL-10 bewirkt eine niedrigere IgA- und IgM-Produktion, die Produktion von IgG dagegen scheint stimuliert zu werden. Die Zugabe von IL-6 zu IL-4 + IL-10 ruft ebenfalls eine erniedrigte IgA-Immunglobulinproduktion hervor. Im Vergleich dazu sind die durch diese Kombination er-

zielten relativen Konzentrationen an IgG und IgM erhöht. Die beschriebenen Ergebnisse sind in Abb. 5 graphisch abgebildet.

Die signifikanten Unterschiede sind in Tab. 12 zusammengefasst. Es werden die Irrtumswahrscheinlichkeiten und der Trend der Änderung dargestellt.

#### **4.2.3 Vergleich der relativen Immunglobulinproduktion bei Patienten unter sublingualer Immuntherapie mit den relativen Konzentrationen bei Patienten vor Therapiebeginn**

Die Stimulation mit IL-4 oder IL-6 bewirkt unter der Sublingualen Immuntherapie eine höhere relative IgG-Produktion als vor Einleitung einer Immuntherapie. Die Immunglobulinproduktion durch IL-10 ist im Gegensatz dazu niedriger als vor Therapie. Eine relativ höhere IgM-Produktion konnte durch die alleinige Stimulation mit IL-6 bzw. IL-13 gemessen werden. IgG wurde im Vergleich zu den Ansätzen vor Therapie nach Stimulation mit IL-13 weniger produziert.

Höhere Konzentrationen von IgA und IgM konnten bei Stimulation durch die Interleukinkombinationen von IL-10 mit IL-6, IL-11 bzw. IL-13 gemessen werden. Durch die Kombination mit IL-13 konnte ebenso eine höhere relative Konzentration an IgG bestimmt werden. Die Kostimulation von IL-4, IL-6 und IL-10 bewirkte eine erhöhte Produktion von IgA im Vergleich zu den Werten vor Therapiebeginn, im Gegensatz dazu zeigten sich hierbei niedrigere Werte an IgG und IgM, so wie auch die Kombination von IL-10 mit IL-6 eine niedrigere relative IgG-Produktion und IL-10 mit IL-4 eine niedrigere relative IgM-Produktion hervorriefen (Abb. 6).

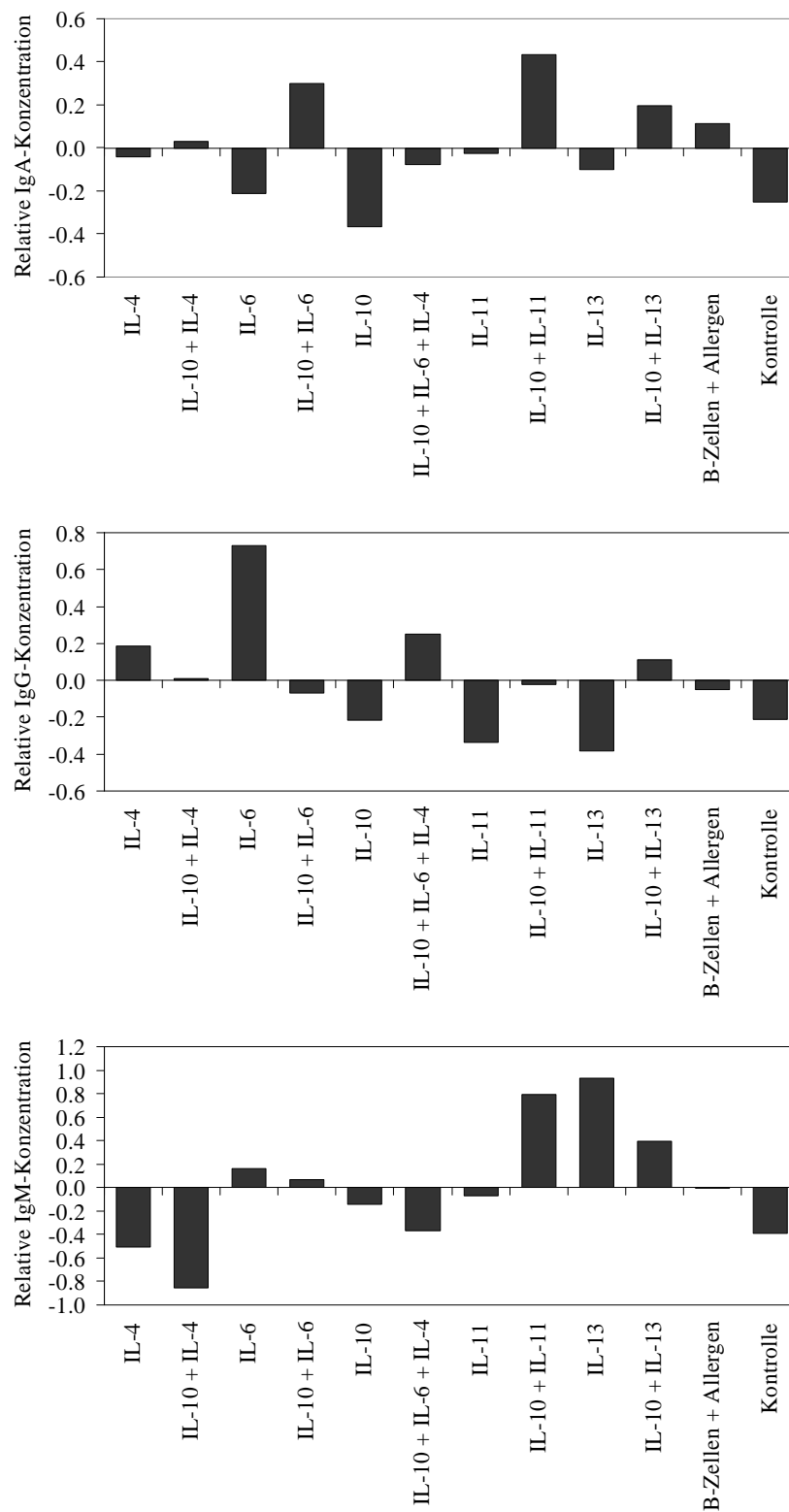


Abb. 5: Mittelwerte der relativen Immunglobulinproduktion in 14tägigen B-Zell-Kulturen (CD40-Assay) unter Stimulation mit unterschiedlichen Interleukinen von Patienten mit einer Frühblüherallergie (n=17) unter Sublingualer Immuntherapie. Die Werte wurden  $\alpha$ -standardisiert.

Tab. 11: Mediane (oben) und Standardfehler (unten, kursiv) zu Abb. 5  
 Relative Immunglobulinproduktion in 14tägigen B-Zell-Kulturen (CD40-Assay)  
 unter Stimulation mit unterschiedlichen Interleukinen von Patienten mit einer  
 Frühblüherallergie (n=17) unter Sublingualer Immuntherapie.

	<b>IgA</b>	<b>IgG</b>	<b>IgM</b>
IL-4	-0.29	0.34	-0.51
	<i>0.21</i>	<i>0.16</i>	<i>0.16</i>
IL-10 + IL-4	-0.31	0.60	-0.12
	<i>0.26</i>	<i>0.27</i>	<i>0.12</i>
IL-6	-0.51	-0.31	-0.51
	<i>0.21</i>	<i>0.28</i>	<i>0.23</i>
IL-10 + IL-6	-0.26	-0.35	-0.44
	<i>0.29</i>	<i>0.23</i>	<i>0.19</i>
IL-10	-0.29	-0.50	0.51
	<i>0.12</i>	<i>0.16</i>	<i>0.19</i>
IL-10 + IL-6 + IL-4	-0.01	-0.28	0.13
	<i>0.13</i>	<i>0.19</i>	<i>0.17</i>
IL-11	0.03	-0.28	1.00
	<i>0.17</i>	<i>0.18</i>	<i>0.19</i>
IL-10 + IL-11	0.51	-0.26	-0.09
	<i>0.31</i>	<i>0.15</i>	<i>0.21</i>
IL-13	-0.29	0.01	-0.64
	<i>0.18</i>	<i>0.28</i>	<i>0.32</i>
IL-10 + IL-13	-0.17	0.14	-0.44
	<i>0.23</i>	<i>0.17</i>	<i>0.23</i>
B-Zellen + Allergen	-0.29	-0.15	-0.27
	<i>0.26</i>	<i>0.24</i>	<i>0.16</i>
Kontrolle	-0.49	-0.38	-0.44
	<i>0.23</i>	<i>0.28</i>	<i>0.13</i>



Tab. 12: Irrtumswahrscheinlichkeiten für signifikante Unterschiede bei Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher unter SLIT zu Abb. 5

Pfeil nach unten: niedrigere Ig-Produktion durch die zweite IL-Komponente  
Pfeil nach oben: höhere Ig-Produktion durch das zweite Interleukin bzw. die zweite Interleukinkombination

Interleukinkombinationen		Irrtumswahrscheinlichkeiten		
		IgA	IgG	IgM
Kontrolle	IL-4			
Kontrolle	IL-4 + IL-10			
Kontrolle	IL-6		0,03 ↑	
Kontrolle	IL-6 + IL-10			
Kontrolle	IL-10			
Kontrolle	IL-4 + IL-6 + IL-10			
Kontrolle	IL-11			
Kontrolle	IL-11 + IL-10			<0,01 ↑
Kontrolle	IL-13			0,02 ↑
Kontrolle	IL-13 + IL-10			
IL-4	IL-4 + IL-10			
IL-4	IL-4 + IL-6 + IL-10			
IL-6	IL-10 + IL-6		0,04 ↓	
IL-6	IL-4 + IL-6 + IL-10			
IL-10	IL-4 + IL-10			0,04 ↓
IL-10	IL-6 + IL-10			
IL-10	IL-4 + IL-6 + IL-10			
IL-10	IL-11 + IL-10	0,04 ↑		0,03 ↑
IL-10	IL-13 + IL-10			
IL-11	IL-11 + IL-10			
IL-13	IL-13 + IL-10			
IL-4	IL-6			
IL-4	IL-10			
IL-4	IL-11			
IL-4	IL-13			<0,01 ↑
IL-6	IL-10		0,01 ↓	
IL-6	IL-11		<0,01 ↓	
IL-6	IL-13		0,01 ↓	
IL-10	IL-11			
IL-10	IL-13			
IL-11	IL-13			
IL-4 + IL-10	IL-6 + IL-10			0,01 ↑
IL-4 + IL-10	IL-11 + IL-10			<0,01 ↑
IL-4 + IL-10	IL-13 + IL-10			<0,01 ↑
IL-4 + IL-10	IL-4 + IL-6 + IL-10			
IL-6 + IL-10	IL-11 + IL-10			
IL-6 + IL-10	IL-13 + IL-10			
IL-6 + IL-10	IL-4 + IL-6 + IL-10			
IL-11 + IL-10	IL-13 + IL-10			
IL-11 + IL-10	IL-4 + IL-6 + IL-10			<0,01 ↓

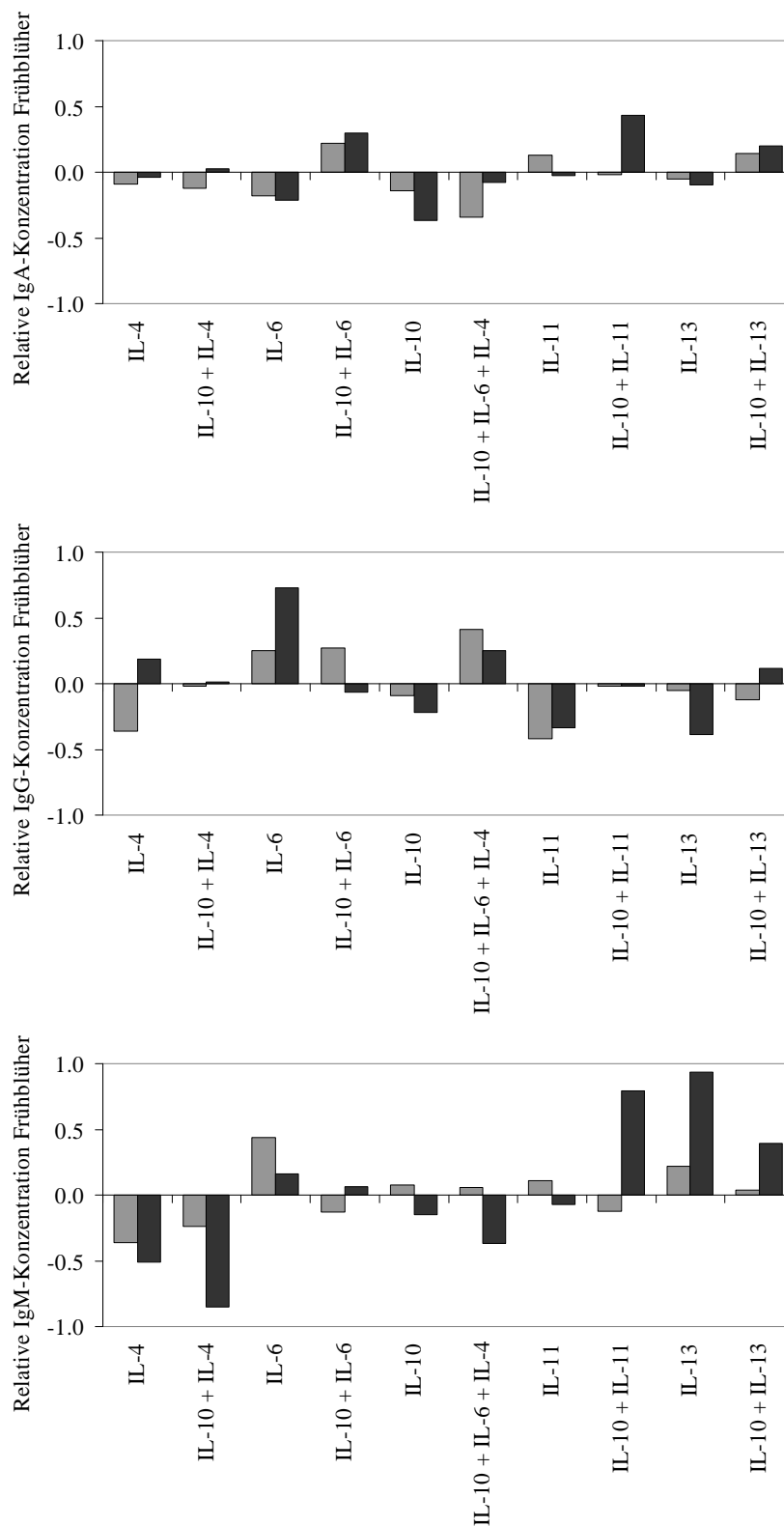


Abb. 6: Vergleich der relativen Immunglobulinkonzentration vor (grau) und während (schwarz) der Sublingualen Immuntherapie bei Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher

### **4.3 Patienten mit einer Allergie auf Gräserpollen**

#### **4.3.1 Vergleich der relativen Immunglobulinproduktion mit den Kontrollansätzen**

Die alleinige Zugabe von IL-4 zu den Kontrollansätzen bewirkt bei den Patienten mit einer Gräserallergie wie auch bei den Patienten mit einer Frühblüherallergie bereits beschrieben eine eher niedrige relative Immunglobulinproduktion, lediglich die relative IgM-Produktion erscheint etwas erhöht. Die Stimulation durch die Interleukine IL-6, IL-11 oder IL-13 bewirkt ebenso eine eher mäßige bis geringe relative Immunglobulinproduktion. Durch die alleinige Zugabe von IL-11 wird die IgM-Produktion im Vergleich zu den anderen Interleukinen z.T. signifikant supprimiert. Im Gegensatz zu den Patienten mit einer Frühblüherallergie wird bei den Gräserallergieklienten eine deutlich erhöhte relative Immunglobulinkonzentration durch die Stimulation mit IL-10 allein beobachtet (Abb. 6).

#### **4.3.2 Vergleich der relativen Immunglobulinproduktion bei verschiedenen Interleukinkombinationen**

Die Kostimulation durch IL-10 und ein anderes Interleukin bewirkt in den meisten Fällen eine Suppression der relativen Immunglobulinproduktion. So verringert sich die IgG-Konzentration bei jeder Interleukinkombination im Gegensatz zu der durch die einzelnen Interleukine hervorgerufenen relativen Produktion. Auch die IgM-Produktion wird außer durch die Kostimulation von IL-10 und IL-11 leicht erniedrigt. Wie schon bei den Frühblüherallergien beschrieben, zeigt sich auch hier durch die Kostimulation von IL-10 und IL-11 ein signifikanter Anstieg der IgM-Produktion im Gegensatz zur IgM-Produktion durch IL-11 allein. Bezüglich der IgA-Produktion wird eine Suppression der Immunglobulinkonzentrationen nur bei Zugabe von IL-10 zu IL-6 festgestellt. Alle anderen Kostimulationen bewirken einen geringen Anstieg der relativen IgA-Produktion.

Die Kombination der Interleukine IL-4, IL-6 und IL-10 bewirkt, wie auch bei den Patienten mit einer Frühblüherallergie bereits beobachtet, eine eher niedrige IgA- und IgM-Produktion, IgG zeigt einen relativ höheren Mittelwert. Die IgA- und IgM-Konzentrationen sind deutlich niedriger als durch alleinige Stimulation mit einem dieser drei Interleukine. Die Zugabe der Interleukinkombination aus IL-4 + IL-6 zu IL-10 bewirkt eine Suppression der relativen Immunglobulinproduktionen. Die Kostimulation durch alle drei Interleukine erzielt eine höhere IgG-Produktion als nur durch IL-4 + IL-10 oder IL-6 + IL-10 und eine niedrigere IgM-Konzentration, d.h. die Zugabe von IL-4 oder IL-6 kann die IgG-Produktion stimulieren und

die IgM-Produktion hemmen. Abbildung 7 stellt die Ergebnisse der Patienten mit einer Gräserpollenallergie unter Sublingualer Immuntherapie graphisch dar.

Die signifikanten Unterschiede sind mit Irrtumswahrscheinlichkeiten und dem Trend der Änderung in Tab. 14 zusammengefasst.

#### **4.3.3 Vergleich der relativen Immunglobulinproduktion bei Patienten unter sublingualer Immuntherapie mit den relativen Konzentrationen bei Patienten vor Therapiebeginn**

Die Stimulation von IL-4 bewirkt eine deutlich erhöhte relative IgM-Produktion und eine leichte Erhöhung der relativen Konzentrationen von IgA und IgG. Durch Stimulation mit IL-6 kann v.a. die relative IgG-Produktion erhöht werden, die alleinige Stimulation mit IL-10 bewirkt eine deutliche Zunahme von IgA. Die relative IgM-Produktion wird durch Stimulation mit IL-11 reduziert, während IgG und IgA leicht höhere Werte nachweisen lassen. Unter Stimulation mit IL-13 kann keine Änderung der relativen Immunglobulinkonzentrationen festgestellt werden.

Die Kombination von IL-10 mit IL-6 bzw. mit IL-13 bewirkt eine erniedrigte relative Produktion aller drei beachteter Immunglobuline, so wie auch die Kombination von IL-10 mit IL-4 eine geringere IgG-Konzentration zur Folge hat, im Gegensatz dazu aber eine höhere Konzentration an IgA und IgM hervorruft. Ebenfalls eine höhere IgA- und IgM-Produktion kann durch die Kostimulation von IL-10 mit IL-11 erreicht werden (Abb. 8).

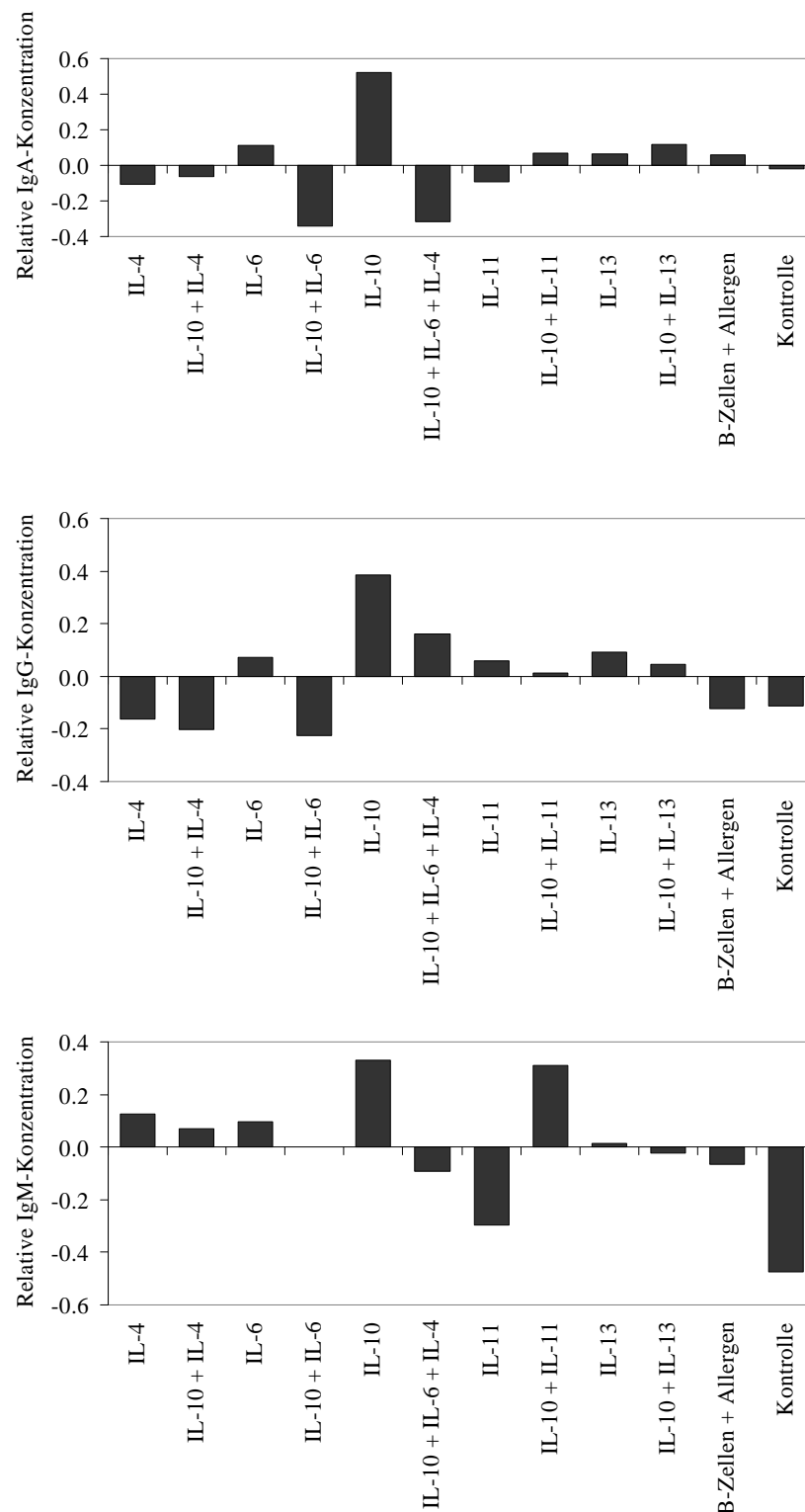


Abb. 7: Mittelwerte der relativen Immunglobulinproduktion in 14tägigen B-Zell-Kulturen (CD40-Assay) unter Stimulation mit unterschiedlichen Interleukinen von Patienten mit einer Gräserpollenallergie (n=36) unter Sublingualer Immuntherapie. Die Werte wurden  $\alpha$ -standardisiert.

Tab. 13: Mediane (oben) und Standardfehler (unten, kursiv) zu Abb. 6  
 Relative Immunglobulinproduktion in 14tägigen B-Zell-Kulturen (CD40-Assay)  
 unter Stimulation mit unterschiedlichen Interleukinen von Patienten mit einer  
 Gräserpollenallergie (n=35) unter Sublingualer Immuntherapie.

	<b>IgA</b>	<b>IgG</b>	<b>IgM</b>
IL-4	-0.29	-0.43	-0.28
	<i>0.12</i>	<i>0.17</i>	<i>0.18</i>
IL-10 + IL-4	-0.33	-0.43	-0.39
	<i>0.17</i>	<i>0.17</i>	<i>0.20</i>
IL-6	-0.10	-0.16	-0.09
	<i>0.12</i>	<i>0.11</i>	<i>0.11</i>
IL-10 + IL-6	-0.58	-0.35	-0.37
	<i>0.20</i>	<i>0.20</i>	<i>0.17</i>
IL-10	0.40	0.17	0.24
	<i>0.18</i>	<i>0.17</i>	<i>0.14</i>
IL-10 + IL-6 + IL-4	-0.56	-0.25	-0.25
	<i>0.14</i>	<i>0.17</i>	<i>0.15</i>
IL-11	-0.48	-0.29	-0.42
	<i>0.17</i>	<i>0.19</i>	<i>0.10</i>
IL-10 + IL-11	-0.10	-0.29	0.19
	<i>0.13</i>	<i>0.14</i>	<i>0.21</i>
IL-13	-0.30	-0.29	-0.36
	<i>0.15</i>	<i>0.17</i>	<i>0.13</i>
IL-10 + IL-13	-0.22	0.02	-0.27
	<i>0.14</i>	<i>0.13</i>	<i>0.17</i>
B-Zellen + Allergen	-0.36	-0.29	-0.29
	<i>0.19</i>	<i>0.10</i>	<i>0.14</i>
Kontrolle	-0.28	-0.29	-0.50
	<i>0.15</i>	<i>0.13</i>	<i>0.12</i>

Tab. 14: Irrtumswahrscheinlichkeiten für signifikante Unterschiede bei Patienten mit einer Allergie auf Gräserpollen unter Sublingualer Immuntherapie

Pfeil nach unten: niedrigere Ig-Produktion durch die zweite IL-Komponente  
Pfeil nach oben: höhere Ig-Produktion durch das zweite Interleukin bzw. die zweite Interleukinkombination

Interleukinkombinationen		Irrtumswahrscheinlichkeiten		
		IgA	IgG	IgM
Kontrolle	IL-4			0,02 ↑
Kontrolle	IL-4 + IL-10			0,04 ↑
Kontrolle	IL-6			<0,01 ↑
Kontrolle	IL-6 + IL-10			0,04 ↑
Kontrolle	IL-10	0,04 ↑	0,04 ↑	<0,01 ↑
Kontrolle	IL-4 + IL-6 + IL-10			
Kontrolle	IL-11			
Kontrolle	IL-11 + IL-10			<0,01 ↑
Kontrolle	IL-13			0,02 ↑
Kontrolle	IL-13 + IL-10			
IL-4	IL-4 + IL-10			
IL-4	IL-4 + IL-6 + IL-10			
IL-6	IL-10 + IL-6			
IL-6	IL-4 + IL-6 + IL-10	0,04 ↑		
IL-10	IL-4 + IL-10	0,04 ↓	0,03 ↓	
IL-10	IL-6 + IL-10	<0,01 ↓	0,04 ↓	
IL-10	IL-4 + IL-6 + IL-10	<0,01 ↓		
IL-10	IL-11 + IL-10			
IL-10	IL-13 + IL-10			
IL-11	IL-11 + IL-10			0,02 ↑
IL-13	IL-13 + IL-10			
IL-4	IL-6			
IL-4	IL-10	0,01 ↑	0,04 ↑	
IL-4	IL-11			
IL-4	IL-13			
IL-6	IL-10			
IL-6	IL-11			0,02 ↓
IL-6	IL-13			
IL-10	IL-11	0,03 ↓		<0,01 ↓
IL-10	IL-13			
IL-11	IL-13			
IL-4 + IL-10	IL-6 + IL-10			
IL-4 + IL-10	IL-11 + IL-10			
IL-4 + IL-10	IL-13 + IL-10			
IL-4 + IL-10	IL-4 + IL-6 + IL-10			
IL-6 + IL-10	IL-11 + IL-10			
IL-6 + IL-10	IL-13 + IL-10			
IL-6 + IL-10	IL-4 + IL-6 + IL-10			
IL-11 + IL-10	IL-13 + IL-10			
IL-11 + IL-10	IL-4 + IL-6 + IL-10			

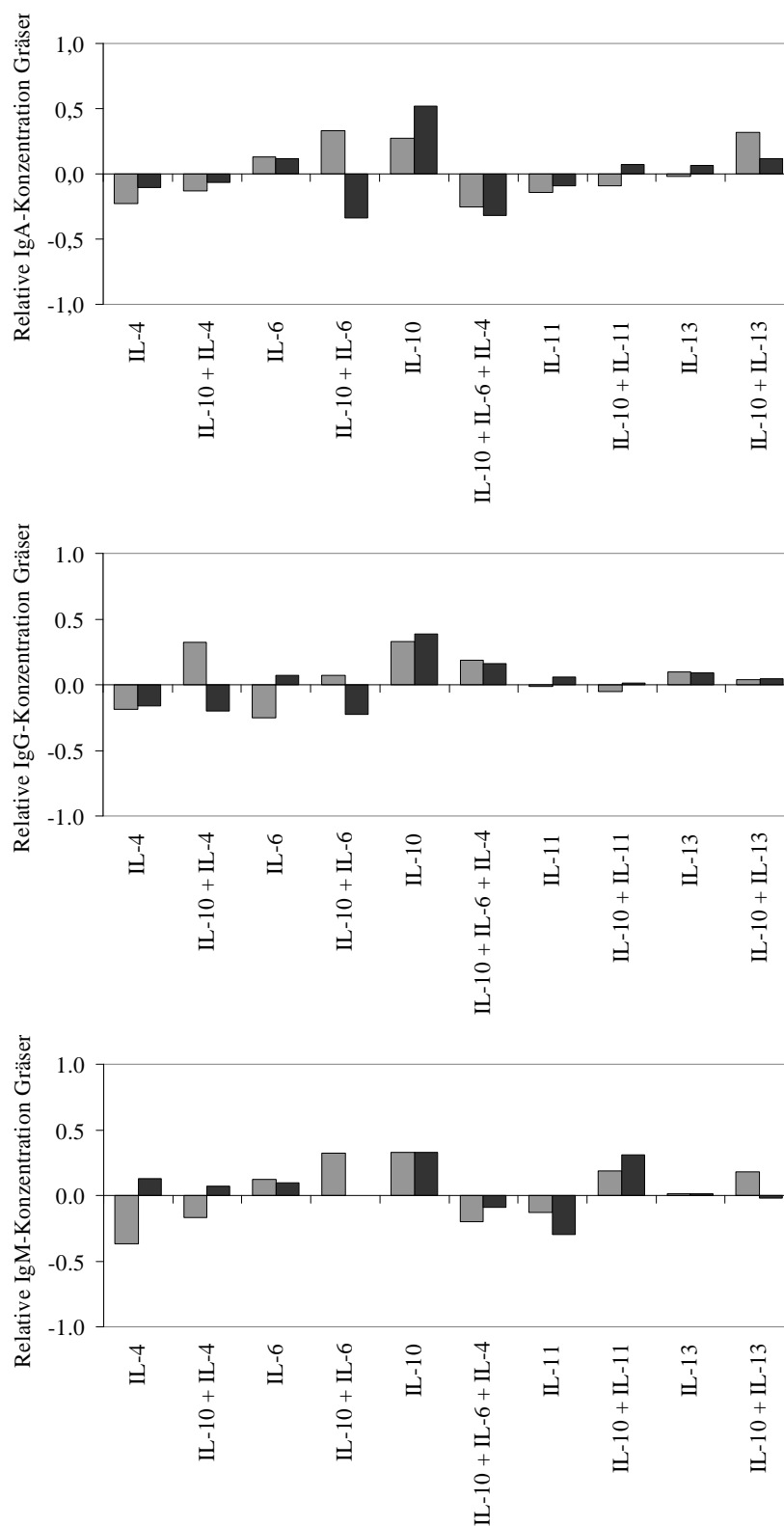


Abb. 8: Vergleich der relativen Immunglobulinkonzentration vor (grau) und während (schwarz) der Sublingualen Immuntherapie bei Patienten mit einer Allergie auf Gräserpollen



#### **4.4 Patienten mit einer Allergie auf Hausstaubmilben**

##### **4.4.1 Vergleich der relativen Immunglobulinproduktion mit den Kontrollansätzen**

Die alleinige Stimulation der B-Zellen durch IL-4 bewirkt wie bereits in den oberen beiden Abschnitten beschrieben auch bei den Patienten mit einer Hausstaubmilbenallergie eine eher niedrige relative Immunglobulinkonzentration. IL-6 scheint v.a. eine Suppression der relativen IgA-Produktion hervorzurufen, IgG und IgM wurden in geringer Konzentration nachgewiesen. Die alleinige Stimulation der B-Zellen im CD40-Assay der Milbenallergiker durch IL-11 verursacht eine deutliche Suppression der relativen Immunglobulinproduktion. Nach der Zugabe von IL-13 wurden wieder geringe Immunglobulinkonzentrationen gemessen. Die alleinige Stimulation durch die Zugabe von IL-10 bewirkt eine wenn auch nicht signifikant erhöhte relative Immunglobulinproduktion (Abb. 7).

##### **4.4.2 Vergleich der relativen Immunglobulinproduktion bei verschiedenen Interleukinkombinationen**

Die Kostimulation durch IL-10 mit einem der anderen zu betrachtenden Interleukine verursacht wie schon bei den Frühblüherallergien und den Gräserallergien beschrieben, verschiedene Reaktionen. So ist wieder eine weitere Suppression der relativen Immunglobulinproduktion unter Zugabe von IL-10 zu IL-4 zu verzeichnen. Ebenso nimmt die relative IgA- und die IgG-Konzentration unter Zugabe von IL-10 zu IL-6 z.T. deutlich ab, wie auch die IgA-Konzentration bei Kostimulation durch IL-11 und IL-10 und die IgM-Konzentration durch die Kostimulation von IL-13 und IL-10 verringert wird.

Sowohl die IgA- als auch die IgG-Produktion werden durch Kostimulation von IL-13 oder IL-10 deutlich angehoben. Des Weiteren zeigt sich ein positiver Einfluss von IL-10 auf die relative Produktion von IgG und IgM im Zusammenhang mit einer Stimulation durch IL-11. Die Erhöhung der relativen Immunglobulinkonzentrationen durch IL-11 und IL-10 im Gegensatz zur alleinigen Stimulation mit IL-11 wurde bereits bei den Patienten mit einer Frühblüher- und denen mit einer Gräserallergie beobachtet. Die relative IgM-Produktion kann ebenfalls durch die Kostimulation von IL-6 und IL-10 erhöht werden. Die Kombination der Interleukine IL-4, IL-6 und IL-10 bewirkt eine eher mäßige relative IgA- und IgM-Produktion, IgG zeigt einen etwas höheren Mittelwert. Die Zugabe von IL-4 zur Kombination aus IL-6 + IL-10 bewirkt eine Stimulation der IgA- und der IgG-Produktion, die Produktion von IgM dagegen wird deutlich reduziert. Die Zugabe von IL-6 zu IL-4 + IL-10 ruft eine erhöhte relative Produktion aller drei beobachteten Immunglobuline hervor.

Die Mittelwerte der gemessenen Ergebnisse der Patienten mit einer Allergie auf Hausstaubmilben unter Sublingualer Immuntherapie sind in Abbildung 9 abgebildet.

Die signifikanten Unterschiede dieser Ergebnisse sind in Tab. 14 zusammengefasst. Es werden die Irrtumswahrscheinlichkeiten und der Trend der Änderung dargestellt.

#### **4.4.3 Vergleich der relativen Immunglobulinproduktion bei Patienten unter sublingualer Immuntherapie mit den relativen Konzentrationen bei Patienten vor Therapiebeginn**

Eine Erhöhung der relativen IgG-Produktion durch die B-Zellen von Allergikern unter Immuntherapie im Vergleich zu denen vor Therapiebeginn kann durch alleinige Stimulation mit IL-4, IL-10 bzw. IL-13 bewirkt werden. Genauso kann die relative IgM-Konzentration durch alleinige Stimulation mit IL-6 oder IL-13 gesteigert werden. Die Stimulation mit IL-11 bewirkt eine Reduktion der relativen Konzentrationen aller drei Immunglobulinklassen.

Ebenso bewirkt die Kombination von IL-10 mit IL-4 eine Reduktion der relativen Produktion aller drei Immunglobuline. Eine erniedrigte relative IgA-Konzentration wird zudem durch die Kostimulation von IL-10 mit IL-11 erzielt, wohingegen die Kombinationen von IL-10 mit IL-13 sowie IL-4 und IL-6 eine Erhöhung der relativen IgA-Konzentration hervorrufen. Die relative IgG-Produktion kann durch Kombination von IL-10 mit IL-6 erniedrigt und durch Kombinationen von IL-10 mit IL-11 bzw. IL-13 erhöht werden. Des Weiteren zeigt sich eine erniedrigte relative IgM-Produktion durch Kostimulation von IL-10 mit IL-13, wohingegen die Kombinationen von IL-10 mit IL-6 oder IL-11 bzw. mit IL-4 und IL-6 eine Zunahme der relativen IgM-Konzentrationen bewirken (Abb. 10).

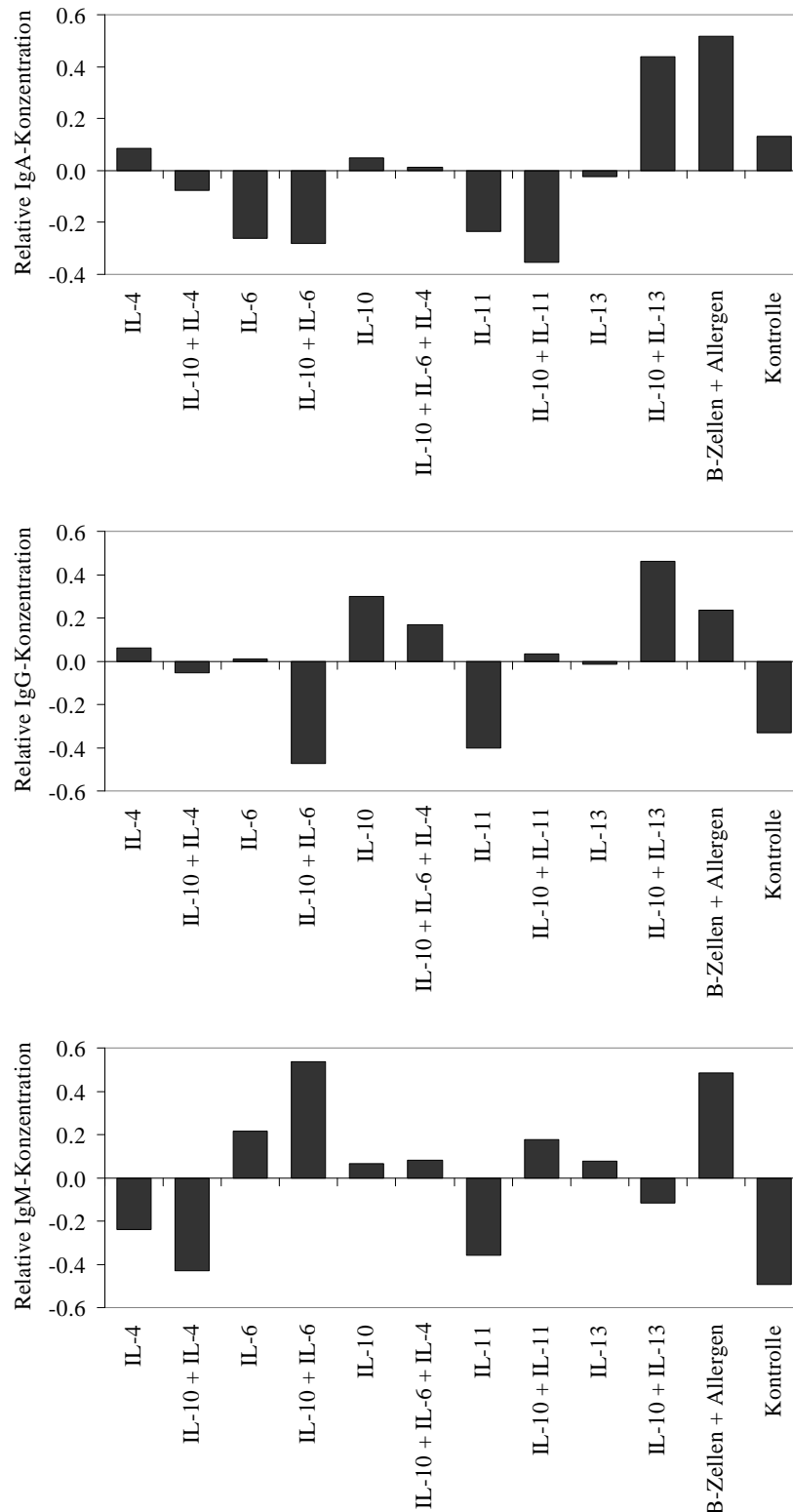


Abb. 9: Mittelwerte der relativen Immunglobulinproduktion in 14tägigen B-Zell-Kulturen (CD40-Assay) unter Stimulation mit unterschiedlichen Interleukinen von Patienten mit einer Hausstaubmilbeallergie (n=22) unter Sublingualer Immuntherapie. Die Werte wurden  $\alpha$ -standardisiert.

Tab. 15: Mediane (oben) und Standardfehler (unten, kursiv) zu Abb. 7  
 Relative Immunglobulinproduktion in 14tägigen B-Zell-Kulturen (CD40-Assay)  
 unter Stimulation mit unterschiedlichen Interleukinen von Patienten mit einer  
 Hausstaubmilbenallergie (n=22) unter Sublingualer Immuntherapie.

	<b>IgA</b>	<b>IgG</b>	<b>IgM</b>
IL-4	-0.08	-0.45	-0.40
	<i>0.19</i>	<i>0.30</i>	<i>0.14</i>
IL-10 + IL-4	-0.29	-0.23	-0.48
	<i>0.18</i>	<i>0.21</i>	<i>0.13</i>
IL-6	-0.49	-0.28	-0.20
	<i>0.17</i>	<i>0.13</i>	<i>0.23</i>
IL-10 + IL-6	-0.47	-0.49	-0.24
	<i>0.21</i>	<i>0.18</i>	<i>0.26</i>
IL-10	-0.14	0.39	-0.09
	<i>0.16</i>	<i>0.16</i>	<i>0.17</i>
IL-10 + IL-6 + IL-4	-0.38	-0.04	-0.19
	<i>0.20</i>	<i>0.19</i>	<i>0.19</i>
IL-11	-0.20	-0.51	-0.35
	<i>0.12</i>	<i>0.11</i>	<i>0.10</i>
IL-10 + IL-11	-0.33	-0.10	-0.32
	<i>0.12</i>	<i>0.18</i>	<i>0.28</i>
IL-13	-0.36	-0.35	-0.26
	<i>0.24</i>	<i>0.22</i>	<i>0.16</i>
IL-10 + IL-13	0.02	-0.18	-0.26
	<i>0.24</i>	<i>0.28</i>	<i>0.14</i>
B-Zellen + Allergen	0.00	-0.12	-0.24
	<i>0.27</i>	<i>0.15</i>	<i>0.27</i>
Kontrolle	-0.14	-0.41	-0.43
	<i>0.19</i>	<i>0.15</i>	<i>0.11</i>

Tab. 16: Irrtumswahrscheinlichkeiten für signifikante Unterschiede bei Patienten mit einer Allergie auf Hausstaubmilben unter Sublingualer Immuntherapie.

Pfeil nach unten: niedrigere Ig-Produktion durch die zweite IL-Komponente  
 Pfeil nach oben: höhere Ig-Produktion durch das zweite Interleukin bzw. die zweite Interleukinkombination

Interleukinkombinationen		Irrtumswahrscheinlichkeiten		
		IgA	IgG	IgM
Kontrolle	IL-4			
Kontrolle	IL-4 + IL-10			
Kontrolle	IL-6			0,02 ↑
Kontrolle	IL-6 + IL-10			<0,01 ↑
Kontrolle	IL-10		0,03 ↑	0,03 ↑
Kontrolle	IL-4 + IL-6 + IL-10			0,03 ↑
Kontrolle	IL-11			
Kontrolle	IL-11 + IL-10			
Kontrolle	IL-13			0,02 ↑
Kontrolle	IL-13 + IL-10			
IL-4	IL-4 + IL-10			
IL-4	IL-4 + IL-6 + IL-10			
IL-6	IL-10 + IL-6			
IL-6	IL-4 + IL-6 + IL-10			
IL-10	IL-4 + IL-10			
IL-10	IL-6 + IL-10		0,02 ↓	
IL-10	IL-4 + IL-6 + IL-10			
IL-10	IL-11 + IL-10			
IL-10	IL-13 + IL-10			
IL-11	IL-11 + IL-10			
IL-13	IL-13 + IL-10			
IL-4	IL-6			
IL-4	IL-10			
IL-4	IL-11			
IL-4	IL-13			
IL-6	IL-10			
IL-6	IL-11			
IL-6	IL-13			
IL-10	IL-11		0,01 ↓	
IL-10	IL-13			
IL-11	IL-13			
IL-4 + IL-10	IL-6 + IL-10			0,01 ↑
IL-4 + IL-10	IL-11 + IL-10			
IL-4 + IL-10	IL-13 + IL-10			
IL-4 + IL-10	IL-4 + IL-6 + IL-10			
IL-6 + IL-10	IL-11 + IL-10			
IL-6 + IL-10	IL-13 + IL-10		0,04 ↑	
IL-6 + IL-10	IL-4 + IL-6 + IL-10			
IL-11 + IL-10	IL-13 + IL-10	0,02 ↑		
IL-11 + IL-10	IL-4 + IL-6 + IL-10			

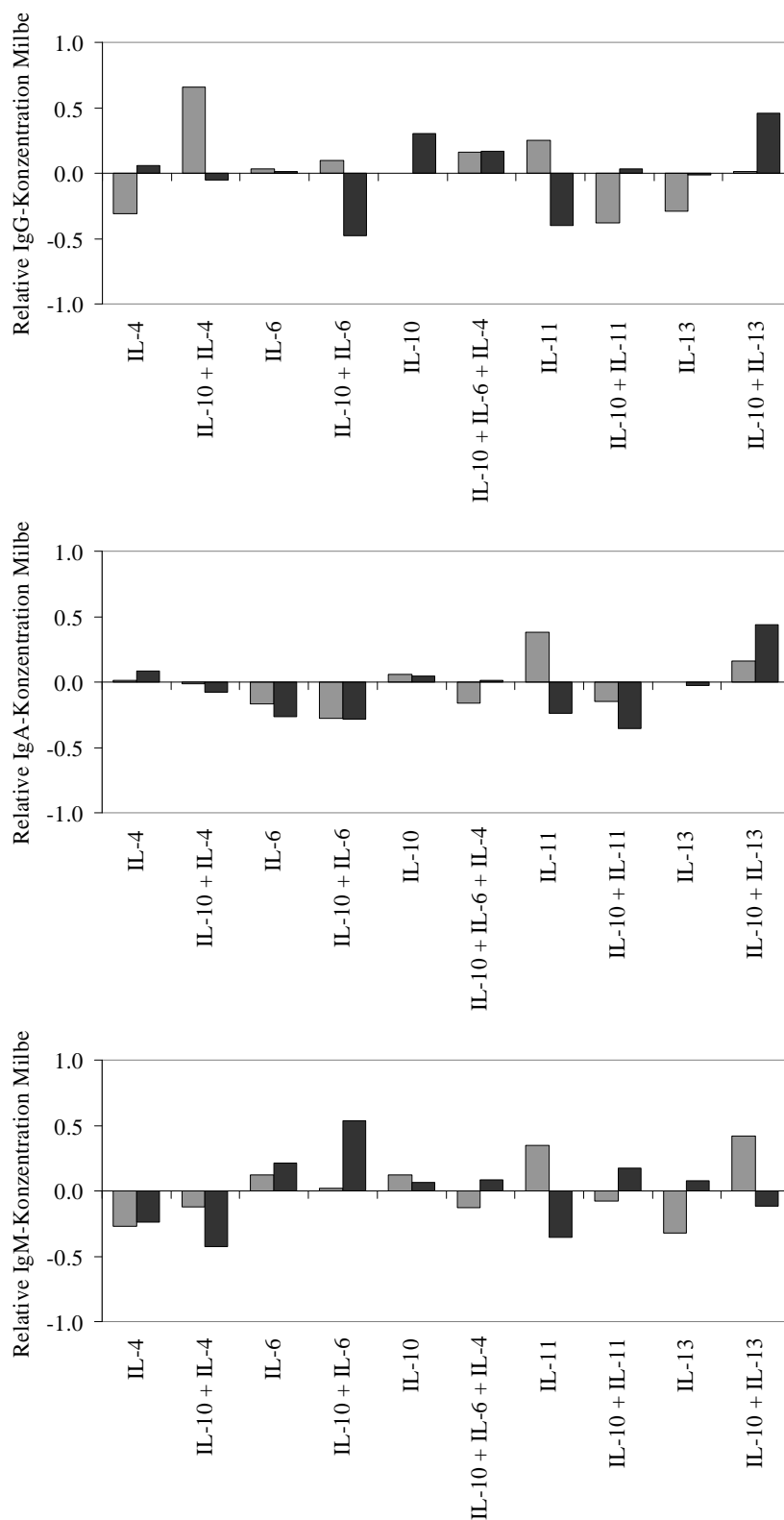


Abb. 10: Vergleich der relativen Immunglobulinkonzentration vor (grau) und während (schwarz) der Sublingualen Immuntherapie bei Patienten mit einer Allergie auf Hausstaubmilben

## 4.5 Immunglobulin A

### 4.5.1 Vergleich der relativen IgA-Produktion durch Stimulation verschiedener Interleukine und deren Kombinationen

Die relative Produktion von IgA wird durch Zugabe von IL-10 zu den anderen Interleukinen bei den Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher z.T. deutlich erhöht. Auch die Patienten mit einer Gräserpollenallergie zeigen bei Kostimulation mit IL-10 und einem anderen Interleukin meist eine Erhöhung der relativen Immunglobulinkonzentration. Ein gegensätzliches Verhalten wird durch die Zugabe von IL-10 zu IL-6 erreicht. Obwohl die alleinige Stimulation durch eines dieser beiden Interleukine eine relativ hohe Immunglobulinkonzentration bewirkt, wird die IgA-Produktion durch die Kostimulation signifikant supprimiert.

Ebenfalls eine Suppression der relativen Immunglobulinproduktion wird durch die Kostimulation von IL-10 und einem anderen Interleukin bei Patienten mit einer Hausstaubmilbenallergie beobachtet. Lediglich IL-13 verhält sich wie anfangs beschrieben, die Zugabe von IL-10 bewirkt eine deutliche Zunahme der relativen IgA-Konzentration (Abb. 11).

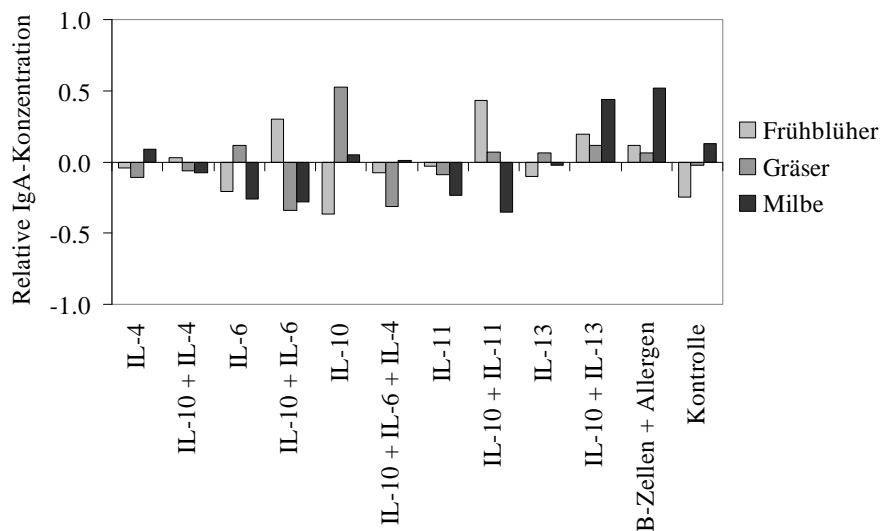


Abb. 11: Relative IgA-Konzentration unter Stimulation verschiedener Interleukine und deren Kombinationen bei Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher, Gräser oder Hausstaubmilben unter Sublingualer Immuntherapie.

#### **4.5.2 Vergleich der relativen IgA-Produktion vor und während der spezifischen Immuntherapie**

Die alleinige Stimulation der B-Zellen mit IL-4 bewirkt bei den Patienten unter spezifischer Immuntherapie eine höhere relative IgA-Produktion als vor Einleitung einer Therapie bei allen drei beobachteten Allergenen. Im Gegensatz dazu ist die relative IgA-Produktion durch die alleinige Stimulation mit IL-6 bei den Patienten unter Therapie bei allen drei Allergenen leicht erniedrigt. Ebenso zeigt die Immunglobulinkonzentration durch alleinige Stimulation mit IL-10, IL-11 oder IL-13 bei den Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher und denen mit einer Allergie auf Hausstaubmilben niedrigere Werte als vor der Therapie. Höhere relative IgA-Konzentrationen werden durch alleinige Stimulation von IL-10, IL-11 oder IL-13 bei den Patienten mit einer Gräserpollenallergie erzielt.

Die Zugabe von IL-10 zu den einzelnen Interleukinen bewirkt bei den Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher eine Erhöhung der relativen IgA-Produktion im Vergleich zu denen vor Einleitung einer Immuntherapie. Dies wird auch bei Kostimulation mit IL-10 und IL-4 sowie IL-10 und IL-11 bei den Gräserpollenallergikern und bei Kostimulation mit IL-10 und IL-13 bei den Milbenallergikern beobachtet. Eine Suppression der relativen IgA-Konzentration im Vergleich zu den Patienten vor Therapie wird durch die Kostimulation mit IL-10 und IL-6 bzw. IL-13 bei den Gräserpollenallergikern sowie durch die Kostimulation mit IL-10 und IL-4 bzw. IL-11 bei den Patienten mit einer Hausstaubmilbenallergie hervorgerufen (Abb. 12).



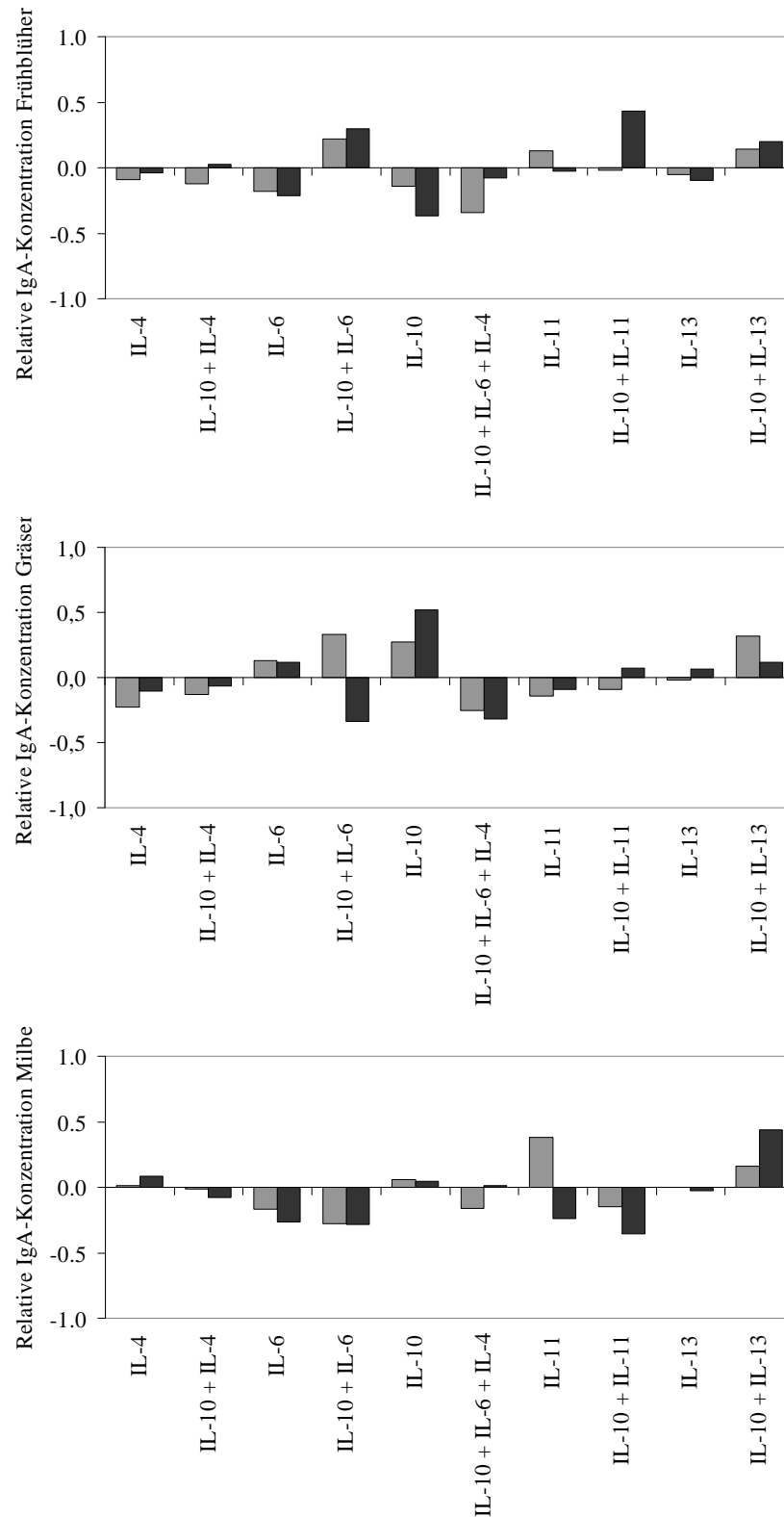


Abb. 12: Vergleich der relativen IgA-Konzentration vor (grau) und während (schwarz) der Sublingualen Immuntherapie bei Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher, Gräser oder Hausstaubmilben

## **4.6 Immunglobulin G**

### **4.6.1 Vergleich der relativen IgG-Produktion durch Stimulation verschiedener Interleukine und deren Kombinationen**

Die relative IgG-Produktion wird bei Patienten mit einer Gräserpollenallergie durch die Zugabe von IL-10 und einem anderen Interleukin supprimiert. Die durch Stimulation mit IL-6 und IL-10 erzielte Immunglobulinkonzentration ist signifikant kleiner als die durch IL-10 alleine bewirkte relative Immunglobulinproduktion. Dieser signifikante Unterschied zeigt sich auch bei der Betrachtung der relativen IgG-Produktion der Hausstaubmilbenallergiker. Ebenso eine Reduktion der relativen Immunglobulinkonzentration wird hier bei Zugabe von IL-10 zu IL-4 erreicht, wenn gleich diese nicht signifikant ist. Bei den Patienten mit einer Frühblüherallergie kann auch bei IL-4 bzw. IL-6 durch Kostimulation mit IL-10 eine Suppression der relativen IgG-Produktion festgestellt werden, wobei die durch IL-6 und IL-10 verursachte supprimierte relative IgG-Konzentration signifikant niedriger ist als die durch die alleinige Stimulation mit IL-6.

Gegensätzlich dazu verhalten sich die Interleukine IL-11 und IL-13. Durch die Zugabe von IL-10 wurde sowohl bei den Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher als auch bei den Patienten mit einer Hausstaubmilbenallergie eine deutliche Zunahme der relativen IgG-Produktion gemessen.

Vergleicht man die relativen Immunglobulinkonzentration, die durch eine Kombination aus den Interleukinen 4, 6 und 10 hervorgerufen wird mit der nur durch IL-4 + IL-10 induzierten relativen Immunglobulinproduktion, wird durch die Zugabe von IL-6 eine weitere Stimulation der relativen IgG-Produktion induziert. Genauso bewirkt die Zugabe von IL-4 zur Kombination aus IL-6 und IL-10 eine Zunahme der relativen Immunglobulinproduktion (Abb. 13).

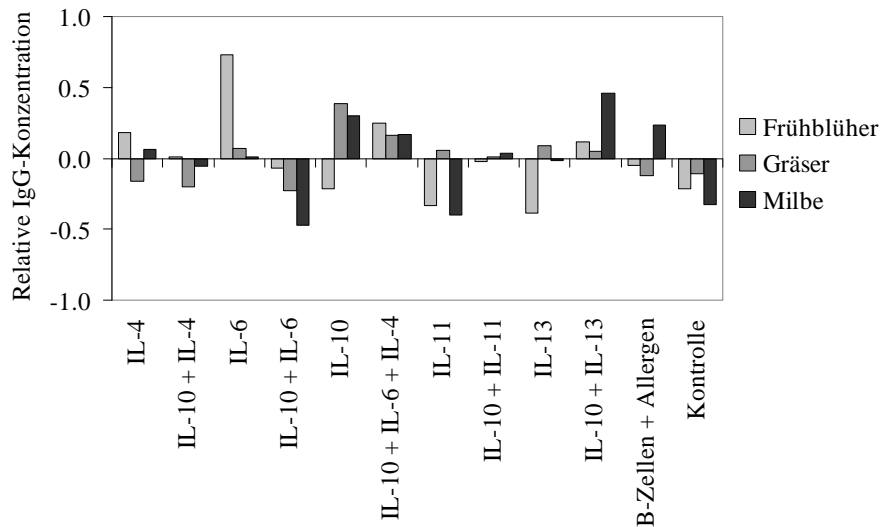


Abb. 13: Relative IgG-Konzentration unter Stimulation verschiedener Interleukine und deren Kombinationen bei Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher, Gräser oder Hausstaubmilben unter Sublingualer Immuntherapie

#### 4.6.2 Vergleich der relativen IgG-Produktion vor und während der spezifischen Immuntherapie

Die relative IgG-Produktion ist durch die alleinige Stimulation der B-Zellen mit IL-4 bei den Patienten unter Sublingualer Immuntherapie höher als bei den Patienten vor Einleitung einer Immuntherapie unabhängig vom Allergen. Ebenfalls eine Erhöhung der relativen IgG-Konzentration wird bei den Patienten mit einer Frühblüherallergie bei Stimulation mit IL-6 bzw. IL-11, bei den Gräserpollenallergikern bei einer Stimulation mit IL-6, IL-10 bzw. IL-11 und bei den Hausstaubmilbenallergikern bei einer Stimulation mit IL-10 bzw. IL-13 beobachtet.

Die Kostimulation mit IL-10 und IL-4 bzw. IL-10 und IL-6 bewirkt bei den Patienten unter Immuntherapie eine niedrigere relative IgG-Konzentration als bei den Patienten vor Einleitung einer solchen Therapie. Im Gegensatz dazu ist die relative IgG-Produktion unter Kostimulation mit IL-10 und IL-11 bzw. IL-10 und IL-13 z.T. deutlich erhöht (Abb. 14).

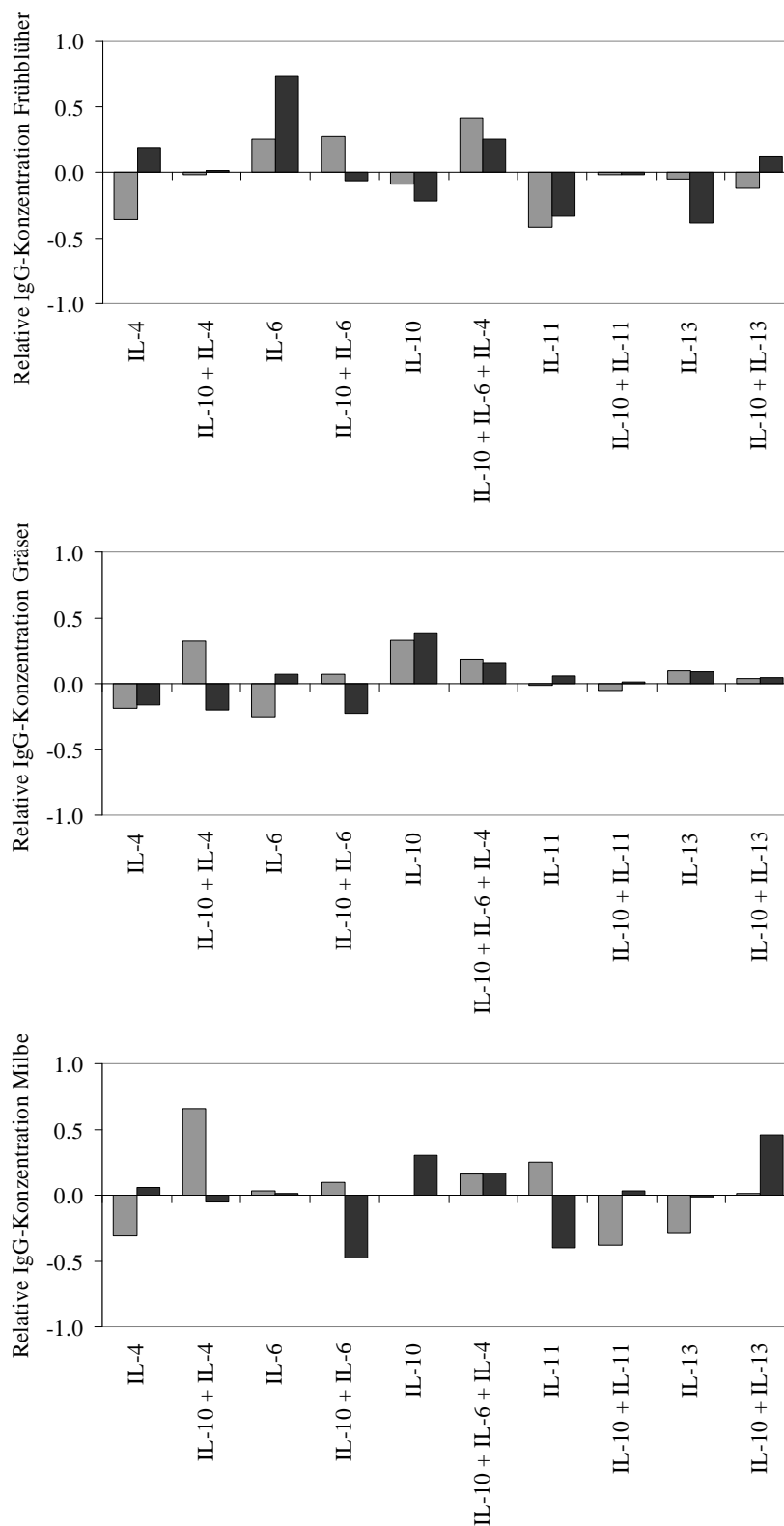


Abb. 14: Vergleich der relativen IgG-Konzentration vor (grau) und während (schwarz) der Sublingualen Immuntherapie bei Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher, Gräser oder Hausstaubmilben

## 4.7 Immunglobulin M

### 4.7.1 Vergleich der relativen IgM-Produktion durch Stimulation verschiedener Interleukine und deren Kombinationen

Die relative IgM-Produktion wird ebenfalls vom Vorhandensein des Interleukins 10 beeinflusst. Die Zugabe von IL-10 zu den Interleukinen IL-4, IL-6 oder IL-13 zeigt bei den Patienten mit einer Gräserpollenallergie und bei den Patienten, die allergisch auf Frühblüher reagieren, eine Suppression der relativen IgM-Konzentration. Auch bei den Patienten mit einer Hausstaubmilbenallergie ist eine solche Suppression durch die Zugabe von IL-10 zu IL-4 bzw. IL-13 zu verzeichnen. Die Kostimulation von IL-6 und IL-10 bewirkt eher eine Erhöhung der relativen IgM-Produktion.

Auffällig ist die deutliche Zunahme der relativen IgM-Konzentration durch die Zugabe von IL-10 zu IL-11. Bei allen drei Patientengruppen ist dieses zu den anderen Interleukinkombinationen gegenläufige Verhalten zu beobachten. Die Gräserpollenallergiker zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich der relativen Immunglobulinkonzentrationen, die durch alleinige Stimulation durch IL-11 hervorgerufen wurden mit denen durch die Kostimulation von IL-11 und IL-10.

Die Zugabe von IL-4 zur Interleukinkombination aus IL-6 und IL-10 erzielt eine Suppression der relativen IgM-Konzentration. Die Zugabe von IL-6 zu IL-4 und IL-10 bewirkt bei den Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher und denen mit einer Hausstaubmilbenallergie eine erhöhte Stimulation der relativen IgM-Produktion. Bei den Gräserpollenallergikern wird durch diese Kombination die relative Immunglobulinproduktion eher supprimiert (Abb.15).

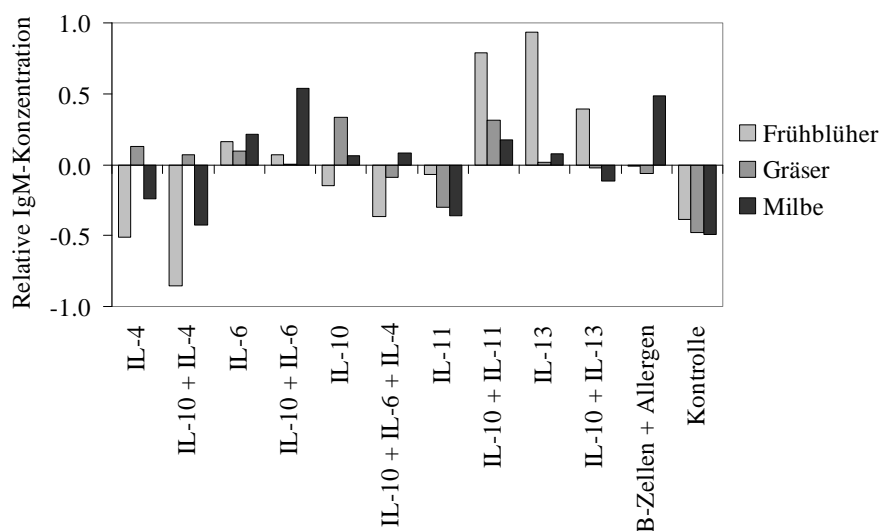


Abb. 15: Relative IgM-Konzentration unter Stimulation verschiedener Interleukine und deren Kombinationen bei Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher, Gräser oder Hausstaubmilben unter Sublingualer Immuntherapie

#### **4.7.2 Vergleich der relativen IgM-Produktion vor und während der spezifischen Immuntherapie**

Die relative IgM-Konzentration ist durch die alleinige Stimulation mit IL-13 z.T. deutlich höher bei den Patienten unter der sublingualen Immuntherapie im Vergleich zu den Patienten vor Einleitung einer Immuntherapie. Im Gegensatz dazu ist die relative IgM-Produktion durch die alleinige Stimulation mit IL-11 bzw. IL-10 reduziert. Ebenfalls eine erniedrigte relative IgM-Konzentration wird durch die Stimulation mit IL-4 bzw. IL-6 bei den Patienten mit einer Frühblüherallergie, sowie durch die Stimulation mit IL-6 bei den Gräserpollenallergikern hervorgerufen. Höhere relative IgM-Konzentrationen sind durch Stimulation der B-Zellen mit IL-4 bei den Gräserpollenallergikern und mit IL-4 bzw. IL-6 bei den Patienten mit einer Allergie auf Hausstaubmilben zu erkennen.

Die Kostimulation mit IL-10 und IL-11 bewirkt bei den behandelten Patienten aller drei beobachteten Allergengruppen eine erhöhte relative IgM-Konzentration im Vergleich zu den Patienten vor Einleitung einer spezifischen Immuntherapie. Ebenso ist die relative Immunglobulinproduktion bei Kostimulation mit IL-10 und IL-6 bzw. IL-13 bei den Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher genauso wie die Kostimulation mit IL-10 und IL-4 bei den Gräserpollenallergikern und die Kostimulation mit IL-10 und IL-6 erhöht.

Gegensätzlich dazu erzielt die Kostimulation mit IL-10 und IL-4 bei den Frühblüherallergikern, die Kostimulation mit IL-10 und IL-6 bzw. IL-13 bei den Patienten mit einer Gräserpollenallergie sowie die Kostimulation mit IL-10 und IL-4 bzw. IL-13 bei den Hausstaubmilbenpatienten eine reduzierte relative IgM-Produktion (Abb. 16).

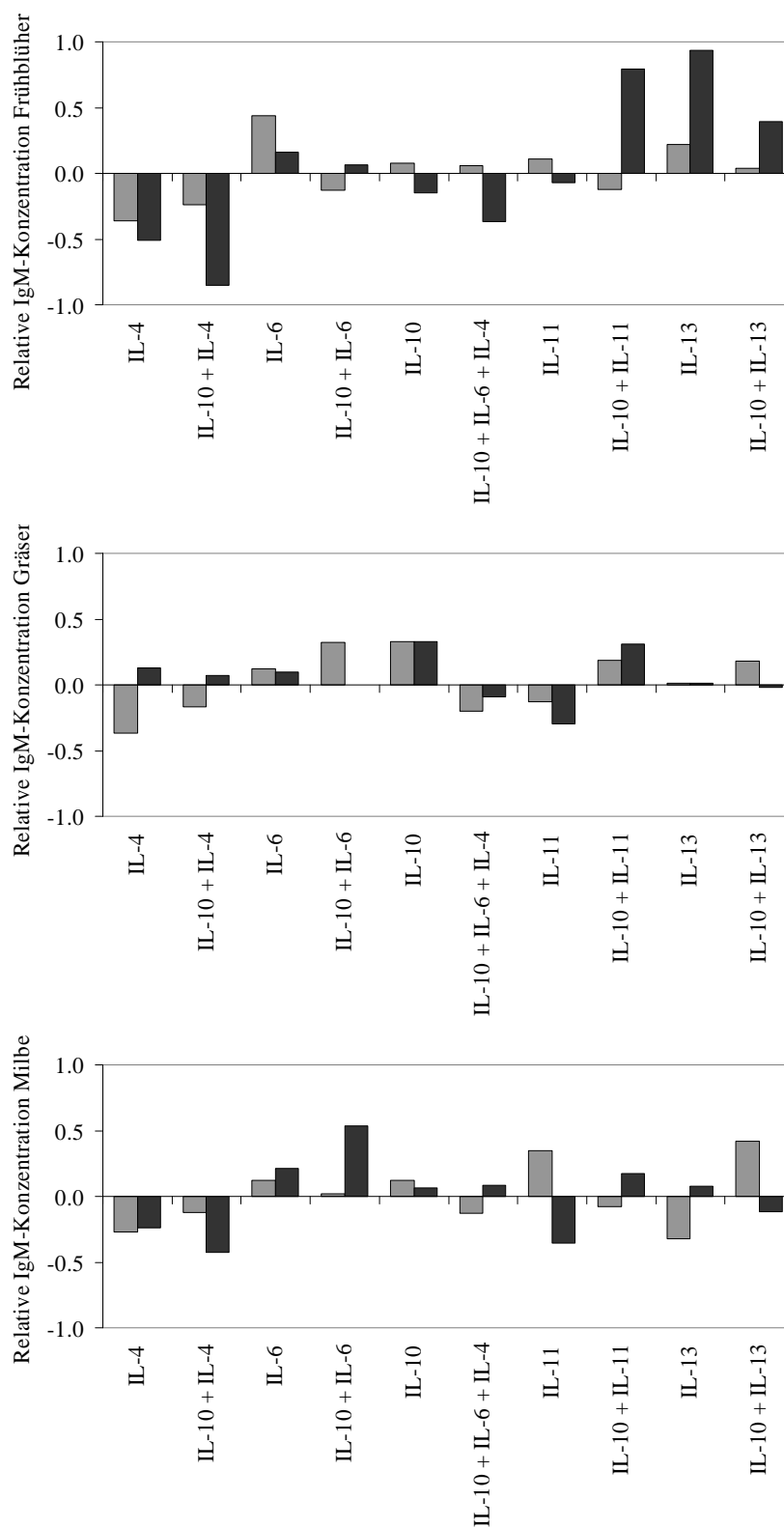


Abb. 16: Vergleich der relativen IgM-Konzentration vor (grau) und während (schwarz) der Sublingualen Immuntherapie bei Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher, Gräser oder Hausstaubmilben

## 5 Diskussion

### 5.1 B-Zell-Kultur-System (CD40-Assay)

Die Immunglobulinproduktion in B-Zell-Kulturen ist, wie in vorangegangenen Textabschnitten gezeigt werden konnte, von einer Aktivierung der B-Zellen mittels CD40-Ligand abhängig. Durch die Zugabe von verschiedenen Interleukinen und deren Kombinationen kann die Immunglobulinproduktion beeinflusst werden (Abb. 17). Dieses System wurde gewählt, da im Gegensatz zu T-Lymphozyten die für die Ko-Kulturen genutzten Ltk-Fibroblasten keine Interleukine exprimieren und somit nur die kontrolliert zugegebenen Interleukine Einfluss auf die B-Lymphozyten nehmen. In den Negativ-Kontrollen vorangegangener Arbeiten, in denen B-Zellen ohne weitere Stimulatoren inkubiert wurden, konnten nahezu keine Immunglobulinkonzentrationen gemessen werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die wenigen anderen neben den B-Zellen vorhandenen Zellen kaum einen direkten Einfluss auf die Immunglobulinproduktion haben (Niess 2001).

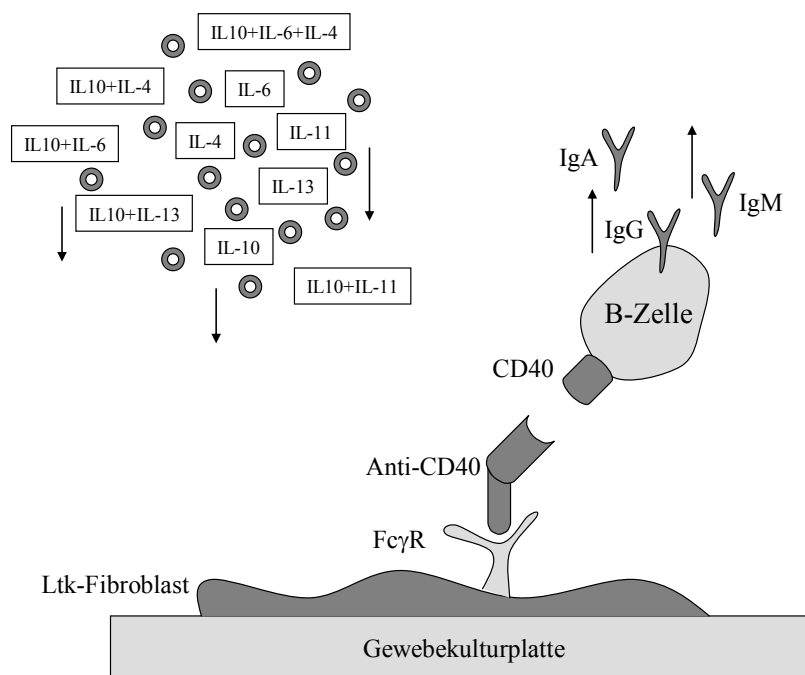


Abb. 17: Immunglobulinproduktion nach Stimulation der B-Zellen mit verschiedenen Interleukinen und deren Kombinationen in Ko-Kultur mit Ltk-Fibroblasten und Anti-CD40



CD40 wird von B-Zellen, Mastzellen, Antigenpräsentierenden Zellen und CD4<sup>+</sup>T-Zellen sezerniert. Es handelt sich um ein 40 kD schweres Molekül auf der Zelloberfläche, welches in die Gruppe der TNF-Rezeptoren gehört (Van Kooten und Bancherau 1997). Die Stimulierung von CD40 initiiert sowohl die Aktivierung als auch die Differenzierung der B-Zellen und den IgE-Klassen-Switch (Van Kooten und Bancherau 1997). CD40 und der entsprechende Gegenrezeptor auf der T-Zell-Oberfläche, der CD40-Ligand, der auch als CD154 bezeichnet wird, sind kostimulatorische Moleküle, die sowohl die Interaktion von MHC Klasse II mit den T-Zell-Rezeptoren und den Interleukinen als auch die Stimulation von B- und T-Zellen bewirken (Van Kooten und Bancherau 1997).

Anti-Human-CD40-IgG ist zur Aktivierung der B-Zellen mittels CD40 erforderlich. Die Abwesenheit dieses Liganden führte in vitro zum Absterben der B-Zellen in den reinen B-Zell-Kulturen (Niess 2001). Durch bestimmte Stimulatoren wie z.B. IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4 und IL-13 ist es in vitro möglich, einen Immunglobulin-Switch von CD40 aktivierten B-Zellen in Richtung von IgA, IgG und IgE zu erzielen (Callard et al. 1993). So ist zum Beispiel die fehlerhafte Interaktion zwischen CD40 und CD154 oder ein defektes CD154 Molekül die Ursache des Hyper-IgM-Syndroms. Hierbei bilden die Patienten nur IgM, wogegen IgA, IgG oder IgE nicht produziert werden können (Callard et al. 1993).

In der aktuellen Arbeit zur Immunglobulinproduktion in B-Zell-Kultur-Systemen bei Kindern mit einer Allergie auf Frühblüher, Gräserpollen oder Hausstaubmilben können Trends hinsichtlich einer Beeinflussung der B-Zellen durch die Stimulation mit einzelnen Interleukinen bzw. mit Interleukinkombinationen beobachtet werden. Allerdings muss immer berücksichtigt werden, dass andere Interleukinkonzentrationen und auch -kombinationen andere als hier beschriebene Wirkungen haben können.

Unser Fazit ist, dass das in dieser Arbeit genutzte Verfahren des B-Zell-Kultur-Systems interessante experimentelle Möglichkeiten bietet. Es ist jedoch sehr komplex, da es aus sehr vielen Einzelschritten besteht und dadurch auch relativ störanfällig ist. Der zeitliche Aufwand von der Blutabnahme über die Zellisolierung, die 14-tägige Ko-Kultur bis hin zur abschließenden ELISA-Messung der Immunglobuline ist sehr groß. Die Methode wird deshalb nie für Routineuntersuchungen einsetzbar sein. Eine Weiterentwicklung und -nutzung dieses Systems für wissenschaftliche Zwecke wird jedoch sinnvoll sein. Inzwischen sind transfizierte CD40-Ligand-exprimierende Fibroblasten erhältlich, wodurch einige Schritte unseres Systems wegfallen können (Reinders et al. 2003)

## 5.2 Interleukin 4

In vorangegangenen Untersuchungen an allergischen Patienten vor Einleitung einer spezifischen Immuntherapie konnte gezeigt werden, dass die relativ niedrigsten IgA-, IgG- und IgM-Konzentrationen nach einer Stimulation von B-Zellen mit IL-4 gemessen wurden (Niess 2001). In den Proben, die mit IL-6, IL-10, IL-11 oder IL-13 stimuliert wurden, zeigten sich höhere relative Konzentrationen der Immunglobuline A, G und M (Niess 2001).

Bei den Patienten unter Sublingualer Immuntherapie bewirkt die alleinige Zugabe von IL-4 zu den Kontrollansätzen mit Ltk-Fibroblasten, CD40-Ligand und B-Zellen von allergischen Patienten ebenfalls eine eher niedrige relative Immunglobulinproduktion, lediglich die relative IgM-Produktion der Patienten mit einer Gräserpollenallergie erscheint etwas erhöht. Allerdings zeigen sich im Vergleich zu den Patienten vor Einleitung einer spezifischen Immuntherapie insgesamt etwas höhere relative IgA- und IgG-Konzentrationen durch die alleinige Stimulation der B-Zellen mit IL-4. Ebenfalls etwas höhere relative IgM-Konzentrationen sind durch Stimulation der B-Zellen mit IL-4 bei den Gräserpollenallergikern und bei den Patienten mit einer Allergie auf Hausstaubmilben unter Therapie zu erkennen. Bei den Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher scheint die relative IgM-Produktion unter Immuntherapie weiterhin sehr niedrig zu bleiben.

Die insgesamt relativ geringe stimulatorische Wirkung von IL-4 in unseren Versuchen deutet daraufhin, dass IL-4 seine Funktion am ehesten in Kombination mit anderen Zytokinen ausübt. Die Reaktion der B-Zellen auf IL-4 allein scheint sich durch die Immuntherapie nur geringfügig zu ändern.

IL-4 wurde ursprünglich als B-Zell-Wachstumsfaktor bezeichnet (BCGF, B Cell Growth Factor), weil es die Synthese von DNA in B-Zellen induziert (Howard et al. 1982). IL-4 ist ein Glycoprotein mit 129 Aminosäuren und wird meist von aktivierten T-Zellen produziert (Bancherau et al. 1994). Als pleiotropes Zytokin wirkt es auf T- und B-Lymphozyten, auf Monozyten, Fibroblasten sowie Endothelzellen und gehört in die Gruppe der  $T_H2$ -Zytokine (Grevers und Röcken 2001). IL-4 kann mit Hilfe der Anwesenheit weiterer stimulierender Faktoren wie immunkompetenter Zellen, CD40 oder anderer Zytokine eine Sekretion von Immunglobulinen induzieren (Bancherau et al. 1994). Spiegelberg et. al beschreiben, dass die Sekretion von IgE und IgG4 durch B-Zellen sowohl bei Gesunden als auch bei atopischen Patienten durch IL-4 induziert werden kann, die Produktion von IgG1, IgG2 und IgG3 aber unbeeinflusst zu sein scheint (Spiegelberg et al. 1991). Die Zellen der atopischen Patienten produzierten mehr IgE und die der Gesunden mehr IgG4 (Spiegelberg et al. 1991). Weiter wurde in der Literatur beschrieben,

dass IL-4 unter Zugabe von IL-13 und Anti-CD40-Antikörpern das Gesamt-IgE erhöht, aber keinen Einfluss auf die allergenspezifische IgE-Konzentration hat (Dolecek et al. 1995). Man geht davon aus, dass im peripheren Blut von Allergikern lang lebende B-Zellen vorhanden sind, die allergenspezifisches IgE produzieren und nicht mehr auf IL-4 oder IL-13 sensibel sind, d.h. sollten Zytokin-Antikörper in der Therapie von Allergien Verwendung finden, müssen sie an einem früheren Punkt der allergischen immunologischen Reaktion angreifen können (Dolecek et al. 1995). Auch Liu et al. beobachteten, dass IL-4 in vitro die IgE-Produktion durch PBMC sowohl bei Gesunden als auch bei Atopikern induziert (Liu et al. 1999). Erhöhte Konzentrationen von IL-4 konnten bei Patienten mit atopischen Krankheiten wie allergische Rhinokonjunktivitis, allergisches Asthma bronchiale sowie atopischer Dermatitis nachgewiesen werden (Mastrandrea 2004). Immuntherapien scheinen auf die IL-4-Expression bei Allergikern Einfluss zu haben. Bereits nach der Einleitungsbehandlung mit 7 Injektionen mit einer Allergoid-Immuntherapie zeigen sich erniedrigte IgE- und erhöhte IgG-, IgG1- und IgG4-Konzentrationen (Keskin et al. 2006).

### 5.3 Interleukin 6

In den Arbeiten mit Blut von allergischen Kindern vor Einleitung einer spezifischen Immuntherapie steigert IL-6 die relative IgG- und IgM-Produktion z.T. signifikant. Im Vergleich zu der Stimulation durch IL-4 ist eine etwas höhere IgA-, IgG- und IgM-Produktion zu beobachten gewesen (Niess 2001).

Bei den Kindern unter sublingualer Immuntherapie bewirkt die Stimulation der B-Zellen mit IL-6 eine erhöhte relative IgG-Produktion, die Produktion von IgA ist bei allen drei Allergenen eher niedrig. Ebenfalls eine erniedrigte relative IgM-Konzentration wird durch die Stimulation der B-Zellen mit IL-6 bei den Patienten mit einer Frühblüherallergie und denen mit einer Gräserpollenallergie hervorgerufen. Höhere relative IgM-Konzentrationen sind durch Stimulation der B-Zellen mit IL-6 bei den Patienten mit einer Allergie auf Hausstaubmilben zu erkennen.

Im Vergleich zu den Patienten vor Einleitung einer Immuntherapie steigt die IgG-Produktion v.a. bei den Pollenallergikern. Bei den Patienten mit einer Hausstaubmilbenallergie kann die IgM-Konzentration erhöht werden.

Insgesamt ergibt sich die Tendenz, dass IL-6 die Produktion von IgG und IgM induziert, insbesondere nach einer Immuntherapie. Das könnte darauf hinweisen, dass die B-Zellen unter der Therapie auf Allergenstimulation eher zu einer physiologischen als zu einer allergischen Entzündungsreaktion neigen.

IL-6 wird durch viele verschiedene Zellen gebildet und beeinflusst die verschiedensten Zellen wie B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen in deren Funktionen, so wird z.B. die Differenzierung der B-Zelle zur Plasmazelle beeinflusst und eine Steigerung der IgM- und IgG-Synthese hervorgerufen (Kishimoto 2005). Transgene Mäuse mit erhöhten IL-6-Spiegeln im Serum zeigen eine polyklonale Globulinerhöhung und eine Plasmozytose (Suematsu et al. 1989). IL-6 gehört zu den Zytokinen der elementaren Entzündungsmediatoren, die bei allen Formen der Entzündung sehr schnell von Makrophagen freigesetzt werden (Grevers und Röcken 2001). Es wird beschrieben, dass IL-6 die Bildung von Akute-Phase-Proteinen wie C-reaktives Protein (CrP) und Fibrinogen bewirkt und bei einer Entzündung im menschlichen Organismus die Synthese von Albumin und Transferritin durch die Leber hemmt (Castell et al. 1989). Kishimoto betrachtet die Erforschung vom IL-6 als sein Lebenswerk, auch er beschreibt, dass IL-6 viele verschiedene Rollen zugeschrieben werden und es bei einer Vielzahl von Krankheiten involviert ist, zudem benennt er den IL-6-Rezeptor als gp130 (Kishimoto 2005). Kishimoto sieht in der Blockade der IL-6-Aktivitäten eine mögliche neue Option zur Behandlung von chronisch entzündlichen Erkrankungen (Kishimoto 2005). Es gibt zahlreiche so genannte IL-6 ähnliche Zytokine ("IL-6 type cytokines"), die vergleichbare biologische Eigenschaften wie IL-6 besitzen, sie verwenden das gleiche gp130 Molekül zur Signaltransduktion (Yin et al. 1993). Aktivierte B-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche den IL-6 Rezeptor, nur bei diesen Zellen kann IL-6 zu einer Induktion der Immunglobulin-Synthese führen. In der Literatur wird beschrieben, dass bei allergischen Patienten erhöhte Konzentrationen an IL-6 im Vergleich zu gesunden Probanden nach gewiesen werden konnten, dabei zeigte sich kein Unterschied, ob die Patienten bereits mit einer spezifischen Immuntherapie behandelt wurden oder noch nicht (Velazquez et al. 2004).

#### **5.4 Interleukin 10**

In den Untersuchungen an Blut von allergischen Patienten vor Einleitung einer spezifischen Immuntherapie zeigte sich ebenfalls eine erhöhte relative IgA-, IgG- und IgM-Produktion nach Stimulation der B-Zellen mit IL-10 (Niess 2001). Zudem konnte eine Steigerung der eher niedrigen Immunglobulinproduktion nach alleiniger Stimulation mit IL-4, IL-6 oder IL-13 durch die Zugabe von IL-10 beobachtet werden (Niess 2002).

Die Stimulation der B-Zellen von allergischen Patienten unter der sublingualen Immuntherapie mit IL-10 im CD-40-Assay zeigt bei den Patienten mit einer Gräserpollenallergie und denen mit einer Allergie auf Hausstaubmilben ebenfalls erhöhte relative Immunglobulinkonzentrationen. Lediglich bei den Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher ist dieser Trend bei allen drei beobachteten Immunglobulinklassen nicht zu verzeichnen. Möglicherweise

spielt der Zeitpunkt der Blutentnahme bezüglich der Pollensaison eine wichtigere als bisher angenommene Rolle. Im Vergleich zu den Untersuchungen an den Patienten vor Beginn der spezifischen Immuntherapie sind einzig bei den Gräserpollenallergikern leicht höhere relative Immunglobulinkonzentrationen zu verzeichnen. In den anderen Gruppen sind überwiegend niedrigere relative Immunglobulinkonzentrationen nach Stimulation mit IL-10 messbar.

Die Beobachtung, dass die Zugabe von IL-10 in Kombination mit anderen Interleukinen eine zusätzliche Stimulation der Immunglobulinproduktion bewirkt, kann bei den Patienten unter der Immuntherapie ebenfalls nicht konform nachvollzogen werden. Die eher niedrige Immunglobulinproduktion unter alleiniger Stimulation mit IL-4 wird z.T. negativ beeinflusst. Die Zugabe von IL-10 zu den mit IL-6 alleine stimulierten Ansätzen zeigt bis auf die IgM-Synthese bei den Hausstaubmilbenallergikern ebenfalls einen weiteren Abfall der relativen Immunglobulinkonzentrationen. Eine z.T. signifikante zusätzliche Stimulation ist bei Zugabe von IL-10 zu einigen bereits mit IL-11 oder IL-13 versetzten Ansätzen zu beobachten. An Hand der Ansätze mit Kostimulation von IL-4, IL-6 und IL-10 ist kein einheitlicher Trend zu erkennen. Hier sind weitere Untersuchungen mit Vergleichen zu anderen Interleukinkombinationen erforderlich.

Zusammengefasst scheint IL-10 bei unbehandelten Allergikern die Produktion von IgM, IgG und IgA zu fördern, weniger aber nach Therapie. Diese Beobachtung kann auf eine relative Verminderung dieser Immunglobuline bei Allergikern hinweisen, die durch IL-10 korrigierbar ist. Unter Immuntherapie ist dieser Effekt dann nicht mehr zu beobachten.

IL-10 ist ein Zytokin, welches v.a. von  $T_{H2}$ -Zellen und Antigenpräsentierenden Zellen (APC) gebildet wird und Immunantworten hemmen kann, wie z.B. die Zytokinproduktion durch die  $T_{H1}$ -Zellen (Grevers und Röcken 2001). In der Literatur wird es auch als Zytokin Synthese Hemmfaktor (Cytokine synthesis inhibitory factor, CSIF) beschrieben, weil es die Produktion von IFN- $\gamma$  durch die  $T_{H1}$ -Zellen hemmt (Fiorentino et al. 1989). Andererseits induziert IL-10 die Aktivierung und Proliferation der B-Zellen, in dem die DNA-Replikation entweder über den Antigen-Rezeptor oder über CD40-Antigen aktiviert wird (Rousset et al. 1992). IL-10 und IL-4 zeigen additive Effekte, sie induzieren eine deutliche Zunahme von verschiedenen Zellen, z.B. stimuliert IL-10 aktivierte B-Zellen, hohe Konzentrationen an IgG und IgA zu sezernieren (Hummelshoj et al. 2006). Werden B-Zellen, die von Patienten mit einem selektiven IgA-Mangel im Serum und in den exokrinen Sekreten stammen, mit IL-10 in vitro stimuliert, steigt die IgA-Synthese (Briere et al. 1994). Bei Patienten mit einem „Common Variable Immunodeficiency Syndrome“ kann in vitro durch die Stimulation der B-Zellen mit IL-10 eine Induktion von

Immunglobulinen hervorgerufen werden (De Waal Malefyt et al. 1992). Das „Common Variable Immunodeficiency Syndrome“ umfasst alle Formen von humoralen Immundefekten, bei denen keine spezifischen Antikörper gebildet und die keinem definierten B-Zell-Defekt zugeordnet werden können.

IL-10 und IL-11 sind zudem als antientzündliche Faktoren bekannt, so wird z.B. IL-10 wie auch CrP als "major antiinflammatory cytokine" von atherosklerotischen Plaques exprimiert (Singh et al. 2006). Die Produktion von IL-10 und IL-11 zeigt sich signifikant niedriger bei Patienten mit akuter RSV (respiratory syncytial virus) -Bronchiolitis und Atopie im Vergleich zu den akut Erkrankten ohne atopischer Diathese (Chung et al. 2005). IL-10 kann die antigeninduzierte bronchiale Hyperreagibilität hemmen und die Konzentration an eosinophilen und neutrophilen Lymphozyten in den Bronchien reduzieren (Fu et al. 2006). IL-10 hat zahlreiche antiallergische Funktionen, einschließlich der Suppression von Mastzellen und Eosinophilen sowie dem Einfluss auf die T-Zell-Antwort und den B-Zell-Switch. IL-10 produzierende T-Zellen werden dementsprechend auch als regulatorische T-Zellen bezeichnet (Till et al. 2004). Durch die spezifische Immuntherapie wird ein Shift von  $T_{H2}$ - zu  $T_{H1}$ -Zellen erreicht, wodurch erhöhte Konzentrationen an IL-10 produziert werden (Bellinghausen et al. 2001). Auf Grund oben beschriebener antientzündlicher Funktionen wird IL-10 auch als Hauptregulator allergischer bzw. atopischer Erkrankungen bezeichnet (Bellinghausen et al. 2001). Während der Sublingualen Immuntherapie wird in der Literatur eine dosisabhängige systemische allergenspezifische Immunantwort beschrieben, bei mit hohen Dosen behandelnden Patienten konnte eine Aktivierung des regulatorischen Zytokins IL-10 beobachtet werden (Savolainen et al. 2006).

Jeannin et al. beschreiben, dass IL-10 in vitro sowohl die IgG4- als auch die IgE-Produktion stimulieren kann, abhängig vom Zeitpunkt der Zugabe des IL-10 zu den B-Zellen von allergischen Patienten. Die maximale IgG4 Produktion konnte dabei gemessen werden, wenn IL-10 innerhalb der ersten 3 Tage zu den B-Zell-Kulturen gegeben wurde. Bei späterer Zugabe erfolgte bereits der IgE-Switch und IL-10 vergrößerte die IgE-Produktion (Jeannin et al. 1998).

## 5.5 Interleukin 11

In vorangegangenen Arbeiten konnte sowohl in Kulturen mit B-Zellen von gesunden Kontrollprobanden als auch von Allergikern vor Einleitung einer Immuntherapie bei Zugabe von IL-11 eine signifikant erhöhte relative IgA-, IgG- und IgM -Produktion festgestellt werden (Niess 2001).

Im Vergleich dazu erzielt die alleinige Zugabe von IL-11 zu den B-Zellen von allergischen Patienten unter Immuntherapie eher niedrige bis mäßig erhöhte relative Immunglobulinkon-

zentrationen. Bei den Patienten mit einer Gräserpollenallergie bewirkt die Zugabe von IL-11 eine signifikante Suppression der IgM-Produktion. Lediglich bei der IgA- und IgG-Produktion war hier ein leichter Anstieg zu sehen.

IL-11 zeigt in den meisten Ansätzen eher geringe stimulatorische Wirkung. Allerdings bewirkt die Kombination aus IL-11 und IL-10 im Vergleich zur alleinigen Gabe eines der beiden Interleukine teilweise signifikante Erhöhungen der Immunglobulinproduktion. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass IL-11 v.a. in Kombination stimulierende Funktionen zu haben scheint und dass die Reaktion der B-Zellen auf IL-11 durch eine Immuntherapie veränderbar ist.

IL-11 wurde Anfang der 90er Jahre von Yin et al. als "novel cytokine" mit einer Vielzahl von biologischen Funktionen teilweise überschneidend mit denen des IL-6 bezeichnet (Yin et al. 1993). IL-11 ist ein so genanntes IL-6 type cytokin, d.h. es besitzt zur Signaltransduktion ebenfalls das Protein gp130 in seinem Rezeptor auf der Zelloberfläche und ist an der Akuten-Phase-Reaktion beteiligt (Yin et al. 1993). Es induziert die Sekretion verschiedener Akute-Phase-Proteine, wie z.B. CrP, Ferritin, Haptoglobin und Fibrinogen durch die Leber (Schwertschlag et al. 1999). Zudem wurde festgestellt, dass IL-11 die Differenzierung von B-Zellen und somit die Produktion von Immunglobulinen nur in Anwesenheit von T-Zellen und Monozyten steigert (Anderson et al. 1991). IL-11 ist einer der bedeutendsten Mediatoren im Prozess der Atemwegsentzündungen, seine Sekretion von Epithelzellen wird von Cysteinyl-Leukotrienen stimuliert (Lee et al. 2007). Es konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass durch die Zugabe von Leukotrienantagonisten bei allergischen Atemwegserkrankungen sowohl die erhöhten Leukotrienkonzentrationen in der bronchioalveolären Lavage als auch die erhöhten IL-11-Level im Lungengewebe reduziert wurden und sich somit eine Abnahme der Atemwegsentzündungen und der bronchialen Hyperreagibilität erreicht wurde (Lee et al. 2007). Bei Patienten mit Asthma korreliert die IL-11-Expression von Eosinophilen und Epithelzellen direkt mit der Schwere der Erkrankung (Zheng et al. 2001). IL-11 zeigt ebenso antientzündliche Effekte, so wird in der Literatur beschrieben, dass IL-11 selektiv die antigeninduzierte Eosinophilie und die  $T_{H2}$ -induzierte Entzündung im Lungengewebe hemmen kann (Wang et al. 2000). In einem Modell an Ratten konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von IL-11 zu entzündetem Lungengewebe dosisabhängig die intrapulmonale Anhäufung von Neutrophilen und den Albuminverlust über die Gefäße reduziert (Lentsch et al. 1999).

## 5.6 Interleukin 13

Im Gegensatz zu IL-4 führte die Stimulation der B-Zellen von allergischen Patienten mit IL-13 in vorangegangenen Arbeiten zu einer z.T. signifikant höheren relativen Immunglobulinproduktion (Niess 2001). IL-13 zeigte sich in Kombination mit IL-10 als einer der stärksten Stimulatoren für die Produktion von IgM (Niess 2001).

Die Stimulation der B-Zellen von allergischen Kindern unter sublingualer Immuntherapie zeigt eine mäßige Änderung der relativen Immunglobulinsynthese. Es können erhöhte IgM-Konzentrationen bei den Patienten mit einer Allergie auf Frühlüher und auf Hausstaubmilben gemessen werden. Die Werte bei den Frühlüherallergikern waren z.T. signifikant höher als durch Stimulation mit anderen Interleukinen. Im Vergleich zu den Patienten vor Einleitung der Immuntherapie zeigt sich eine weitere wenn auch nicht signifikante Steigerung der relativen IgM-Konzentrationen. Die relative IgG-Produktion nimmt unter der Immuntherapie nach Stimulation mit IL-13 bei den Patienten mit einer Hausstaubmilbenallergie ebenfalls zu, während sie bei den Frühlüherallergikern eher supprimiert ist. Bei der Betrachtung der relativen IgA-Konzentrationen kann keine wesentliche Änderung zwischen den Werten vor und während der Immuntherapie festgestellt werden.

Ähnlich den Beobachtungen bei IL-11 kann unter Zugabe von IL-13 zu den B-Zellen von allergischen Patienten unter Spezifischer Immuntherapie eine Änderung, aber keine definitive Richtung der Immunglobulinproduktion dargestellt werden. Vorrangig die IgM-Produktion wird stimulierend beeinflusst, wogegen auf IgA kein Einfluss nachweisbar ist.

IL-13 wird von verschiedenen T-Zellen und von dendritischen Zellen produziert (De Vries 1998). Es ist wie IL-4 ein  $T_H2$ -Zytokin. Beide Interleukine teilen sich als einen Teil ihres Rezeptors die IL-4R $\alpha$ -Kette, welche für die Signaltransduktion von großer Bedeutung ist (Callard et al. 1996). Sie können die proentzündlichen Eigenschaften der Makrophagen unterdrücken und in den B-Zellen den Immunglobulinswitch zu IgE fördern (Grevers und Röcken 2001). Dabei werden durch die Bindung eines dieser beiden Zytokine an den entsprechenden Rezeptor Januskinasen und so genannte STAT-Faktoren (STAT = signal transducer and activator of transcription) aktiviert und so der Isotypenswitch zum IgE initiiert (Grevers und Röcken 2001). T-Zellen exprimieren keinen funktionsfähigen IL-13-Rezeptor, deswegen kann IL-13 im Gegensatz zu IL-4 nicht die  $T_H2$ -Zell-Differenzierung induzieren, ein bedeutendes Merkmal der allergischen Immunreaktion (De Vries 1998). Cocks et al. konnten beobachten, dass die Stimulation von B-Zellen mit IL-13 in Anwesenheit von  $CD4^+$ -T-Zellen zu einer erhöhten Produktion von Gesamt-IgG, IgG4, IgM und IgE, aber nicht von IgA führt (Cocks et al. 1993).



### **5.7 Schlussfolgerungen**

Die von uns durchgeführten Untersuchungen an isolierten B-Zellen von Allergikern unter sublingualer Immuntherapie deuten daraufhin, dass sich die Stimulierbarkeit dieser Zellen durch Interleukine und Allergene in vitro gegenüber Zellen unbehandelter Patienten ändert. Es zeigen sich tendenziell zelluläre Reaktionen, die eher physiologischen Entzündungsreaktionen entsprechen als Reaktionen, wie sie zuvor bei unbehandelten Allergikern beobachtet wurden. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die in vielen Studien beobachteten klinischen Wirkungen der sublingualen Immuntherapie durch Einfluss auf das Verhalten des Immunsystems zu begründen sind.

Das in dieser Arbeit genutzte Verfahren des B-Zell-Kultur-Systems ist jedoch sehr komplex, so dass es sich für klinische Routineuntersuchungen nicht eignen wird. Allerdings bietet eine Weiterentwicklung und -nutzung für wissenschaftliche Zwecke viele interessante experimentelle Möglichkeiten.

## 6 Zusammenfassung

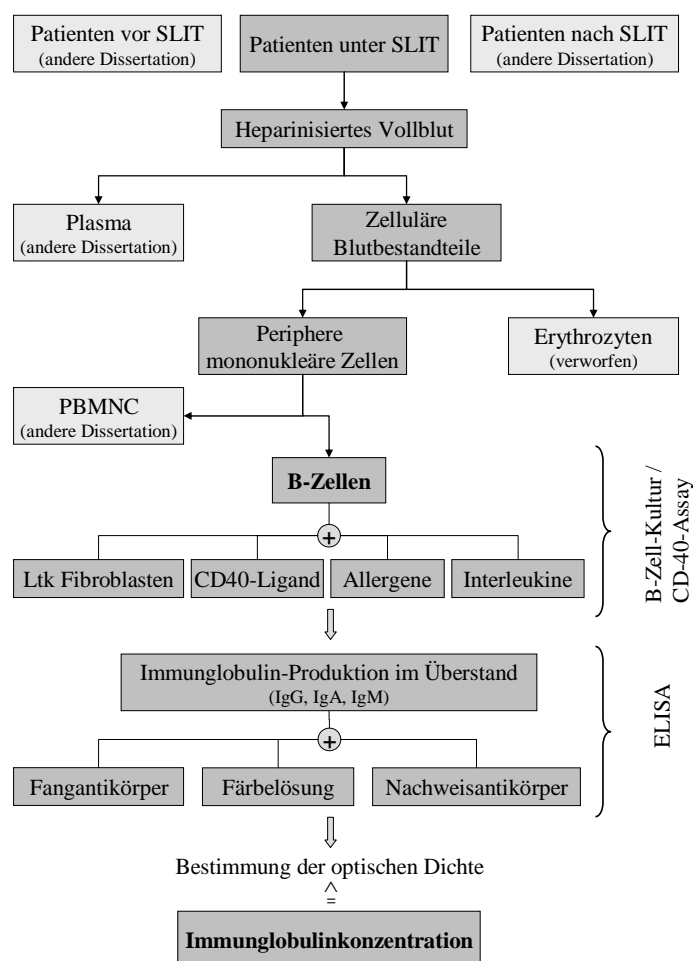
**Hintergrund:** Allergie bezeichnet eine Überempfindlichkeitsreaktion des Organismus auf körperfremde Substanzen, die Allergene. Beim ersten Kontakt des Immunsystems mit dem Allergen läuft eine Sensibilisierungskaskade verschiedener Immunzellen ab, in deren Folge B-Lymphozyten, unterstützt von T-Helfer-Zellen, Eiweiße vom Typ IgE produzieren, die an ihrem variablen Ende maßgeschneiderte Kontaktstellen für das Allergen besitzen. Die IgE-Moleküle binden sich an Mastzellen und werden beim nächsten Kontakt mit dem Allergen durch dieses so miteinander vernetzt, dass sie eine Ausschüttung von körpereigenen Substanzen wie Histamin hervorrufen, die Abwehr- und auch Entzündungsreaktionen vermitteln.

Die einzige kausale Therapie der allergischen Reaktion vom Sofort-Typ ist die Spezifische Immuntherapie, deren immunbiologischer Wirkmechanismus bis heute nicht vollständig geklärt ist. Während er bei der subkutanen Immuntherapie in weiten Teilen verstanden ist, gibt es noch viele Unklarheiten bei der lokalen, speziell der sublingualen Applikation. Es wird von einer Wirkung auf die T-Zellen ausgegangen, eine physiologische Immunantwort soll anstelle der pathologischen allergischen Reaktion erreicht werden. Ob und in welchem Maße die B-Lymphozyten eine maßgebliche Rolle beim Immunglobulinswitch von Allergie auslösenden

IgE zu physiologischen Immunglobulinen spielen, ist unklar.

**Ziele:** In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss von verschiedenen Interleukinen und deren Kombinationen auf die Immunglobulinproduktion von B-Lymphozyten untersucht werden.

**Methoden:** B-Lymphozyten von Kindern, deren allergische Rhinitis bereits durchschnittlich ein Jahr mit einer Sublingualen Immuntherapie behandelt war, wurden in einem B-Zell-Kultur-System, dem CD40-Assay, mit verschiedenen Interleukinen bzw. Interleukinkombinationen und den entsprechenden Allergenen in einem Medium aus Fibroblasten und CD40-Ligand stimuliert. Dieses System wur-



de gewählt, da im Gegensatz zu T-Lymphozyten die genutzten Fibroblasten keine Interleukine exprimieren und somit nur die kontrolliert zugegebenen Interleukine Einfluss auf die B-Lymphozyten nehmen. Die produzierten Immunglobuline wurden mit verschiedenen Antikörpern gefärbt und ihre Konzentration anschließend mittels Bestimmung der optischen Dichte gemessen.

**Ergebnisse:** Es werden Trends hinsichtlich einer Beeinflussung der B-Zellen durch die Interleukin-Stimulation beobachtet. Im Vergleich zu B-Lymphozyten unbehandelter Patienten deutet sich an, dass sich die Stimulierbarkeit der isolierten Zellen von allergischen Patienten unter sublingualer Immuntherapie in vitro ändert. Es zeigen sich tendenziell zelluläre Reaktionen, die eher physiologischen Entzündungsreaktionen entsprechen. Allerdings muss immer berücksichtigt werden, dass andere Interleukinkonzentrationen und -kombinationen andere als hier beschriebene Wirkungen hervorrufen können.

IL-4 zeigt insgesamt eine relativ geringe stimulatorische Wirkung in unseren Versuchen, was darauf deuten kann, dass IL-4 seine Funktion am ehesten in Kombination mit anderen Zytokinen ausübt. IL-6 zeigt tendenziell eine Stimulation der IgG- und IgM-Produktion insbesondere unter einer Immuntherapie. Das könnte darauf hinweisen, dass die B-Zellen nach einer Therapie auf Allergenstimulation eher zu einer physiologischen als zu einer allergischen Entzündungsreaktion neigen. Die Zugabe von IL-10 scheint bei unbehandelten Allergikern die Produktion von IgM, IgG und IgA zu fördern, weniger aber bei den Patienten unter Immuntherapie. Diese Beobachtung kann auf eine relative Verminderung dieser Immunglobuline bei Allergikern hinweisen, die durch IL-10 korrigierbar ist. Unter Immuntherapie ist dieser Effekt dann nicht mehr zu beobachten. IL-11 zeigt in den meisten Ansätzen eher geringe stimulatorische Wirkung. Allerdings bewirkt die Kombination aus IL-11 und IL-10 im Vergleich zur alleinigen Gabe eines der beiden Interleukine teilweise signifikante Erhöhungen der Immunglobulinproduktion. Ähnlich zeigt auch IL-13 alleine keine eindeutige Tendenz der Stimulierung von B-Zellen, in Kombination mit IL-10 wird vereinzelt eine Steigerung der Immunglobulinproduktion erreicht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die einzelnen Interleukine komplexe Funktionen haben und diese durch Kombination änderbar sind.

**Schlussfolgerung:** Es kann davon ausgegangen werden, dass die in vielen Studien beobachteten klinischen Wirkungen der sublingualen Immuntherapie durch Einfluss auf das Verhalten des Immunsystems zu begründen sind. Das in dieser Arbeit genutzte Verfahren des B-Zell-Kultur-Systems ist jedoch sehr komplex, so dass es sich für klinische Routineuntersuchungen nicht eignen wird. Allerdings bietet eine Weiterentwicklung und -nutzung für wissenschaftliche Zwecke viele interessante experimentelle Möglichkeiten.

---

## Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Erläuterung</b>
AAS	Antimycotic antibiotic solution
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ÄDA	Ärzteverband Deutscher Allergologen
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zellen
BCGF	B Cell Growth Factor
CAP	Capacity
CD	Cluster of differentiation (Zelloberflächenantigen)
CrP	C-reaktives Protein
CTLA	Cytotoxic T-lymphocyte antigen
CSIF	Cytokine synthesis inhibitory factor, Zytokin Synthese Hemmfaktor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EAACI	European Academy of Allergology and Clinical Immunology
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FKS	Fetales Kälberserum
IFN	Interferon
ICAM	Intracellular adhesion molecule
Ig	Immunglobuline
IL	Interleukin
LFA	Leucocyte / lymphocyte function-associated antigen
MACS	Magnetic activated cell sorter
MHC	Major histocompatibility complex
MW	Mittelwert
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen

PBMC / PBMNC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphat buffert saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
RAST	Radio-Allergo-Sorbent-Test
RPMI	Rockwell Park Memorial Institute
RSV	Respiratory syncytial virus
SD	Standardabweichung
SIT	Spezifische Immuntherapie
SCIT	Subkutane Immuntherapie
SLIT	Sublinguale Immuntherapie
STAT	Signal transducer and activator of transcription
STU / ml	Spezifische Behandlungseinheit
Tab.	Tabelle
TGF	T-cell growth factor
T <sub>H0</sub> , T <sub>H1</sub> , T <sub>H2</sub>	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
WHO	World Health Organization

---

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Einteilung der allergischen Reaktionen nach Coombs und Gell.....	4
Abb. 2:	Pathomechanismus der allergischen Reaktion vom Sofort-Typ.....	7
Abb. 3:	Versuchsstruktur – Ablauf der experimentellen Untersuchungen.....	30
Abb. 4:	Immunglobulinproduktion nach Stimulation der B-Zellen mit Interleukinen in Ko-Kultur mit Ltk-Fibroblasten und Anti-CD40.....	33
Abb. 5:	Mittelwerte der relativen Immunglobulinproduktion in 14tägigen B-Zell-Kulturen (CD40-Assay) unter Stimulation mit unterschied- lichen Interleukinen von Patienten mit einer Frühblüherallergie (n=17) unter Sublingualer Immuntherapie.....	42
Abb. 6:	Vergleich der relativen Immunglobulinkonzentration vor und während der Sublingualen Immuntherapie bei Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher.....	45
Abb. 7:	Mittelwerte der relativen Immunglobulinproduktion in 14tägigen B-Zell-Kulturen (CD40-Assay) unter Stimulation mit unterschied- lichen Interleukinen von Patienten mit einer Gräserpollenallergie (n=36) unter Sublingualer Immuntherapie.....	48
Abb. 8:	Vergleich der relativen Immunglobulinkonzentration vor und während der Sublingualen Immuntherapie bei Patienten mit einer Allergie auf Gräserpollen.....	51
Abb. 9:	Mittelwerte der relativen Immunglobulinproduktion in 14tägigen B-Zell-Kulturen (CD40-Assay) unter Stimulation mit unterschied- lichen Interleukinen von Patienten mit einer Hausstaubmilbeallergie (n=22) unter Sublingualer Immuntherapie.....	54

Abb. 10:	Vergleich der relativen Immunglobulinkonzentration vor und während der Sublingualen Immuntherapie bei Patienten mit einer Allergie auf Hausstaubmilben.....	57
Abb. 11:	Relative IgA-Konzentration unter Stimulation verschiedener Interleukine und deren Kombinationen bei Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher, Gräser oder Hausstaubmilben unter Sublingualer Immuntherapie.....	58
Abb. 12:	Vergleich der relativen IgA-Konzentration vor und während der Sublingualen Immuntherapie bei Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher, Gräser oder Hausstaubmilben.....	60
Abb. 13:	Relative IgG-Konzentration unter Stimulation verschiedener Interleukine und deren Kombinationen bei Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher, Gräser oder Hausstaubmilben unter Sublingualer Immuntherapie.....	62
Abb. 14:	Vergleich der relativen IgG-Konzentration vor und während der Sublingualen Immuntherapie bei Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher, Gräser oder Hausstaubmilben.....	63
Abb. 15:	Relative IgM-Konzentration unter Stimulation verschiedener Interleukine und deren Kombinationen bei Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher, Gräser oder Hausstaubmilben unter Sublingualer Immuntherapie.....	64
Abb. 16:	Vergleich der relativen IgM-Konzentration vor und während der Sublingualen Immuntherapie bei Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher, Gräser oder Hausstaubmilben.....	66
Abb. 17:	Immunglobulinproduktion nach Stimulation der B-Zellen mit verschiedenen Interleukinen und deren Kombinationen in Ko-Kultur mit Ltk-Fibroblasten und Anti-CD40.....	67

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Immunglobulintypen.....	9
Tab. 2:	Dosierungsschema von Pangramin SLIT® für Flasche 1-4.....	24
Tab. 3:	Verwendete Chemikalien.....	26
Tab. 4:	Verwendete Puffer.....	27
Tab. 5:	Weitere verwendete Materialien.....	28
Tab. 6:	Verwendete Allergene und Antikörper.....	29
Tab. 7:	Interleukinkombinationen.....	34
Tab. 8:	Verwendete Standard-Human-Seren.....	35
Tab. 9:	Mittelwerte der relativen Immunglobulinproduktion in 14tägigen B-Zell-Kulturen (CD40-Assay) unter Stimulation mit unterschiedlichen Interleukinen von Patienten unter SLIT.....	38
Tab. 10:	Mittelwerte der relativen Immunglobulinproduktion in 14tägigen B-Zell-Kulturen (CD40-Assay) unter Stimulation mit unterschiedlichen Interleukinen von Patienten vor Einleitung einer SLIT.....	39
Tab. 11:	Mediane und Standardfehler zu Abb. 5: Relative Immunglobulinproduktion in 14tägigen B-Zell-Kulturen (CD40-Assay) unter Stimulation mit unterschiedlichen Interleukinen von Patienten mit einer Frühblüherallergie (n=17) unter SLIT.....	43
Tab. 12:	Irrtumswahrscheinlichkeiten für signifikante Unterschiede bei Patienten mit einer Allergie auf Frühblüher unter SLIT .....	44



Tab. 13:	Mediane und Standardfehler zu Abb. 6: Relative Immunglobulinproduktion in 14tägigen B-Zell-Kulturen (CD40-Assay) unter Stimulation mit unterschiedlichen Interleukinen von Patienten mit einer Gräserpollenallergie (n=35) unter SLIT.....	49
Tab. 14:	Irrtumswahrscheinlichkeiten für signifikante Unterschiede bei Patienten mit einer Allergie auf Gräserpollen unter SLIT.....	50
Tab. 15:	Mediane und Standardfehler zu Abb. 7: Relative Immunglobulinproduktion in 14tägigen B-Zell-Kulturen (CD40-Assay) unter Stimulation mit unterschiedlichen Interleukinen von Patienten mit einer Hausstaubmilbenallergie (n=22) unter SLIT.....	55
Tab. 16:	Irrtumswahrscheinlichkeiten für signifikante Unterschiede bei Patienten mit einer Allergie auf Hausstaubmilben unter SLIT.....	56

## Literaturverzeichnis

- Akdis CA, Blaser K. 2000. Mechanism of allergen-specific immunotherapy. *Allergy*, 55: 522-30.
- Anderson KC, Morimoto C, Paul SR et al. 1991. Interleukin-11 promotes accessory cell-dependent B cell differentiation in humans. *Blood*, 80:2797-804.
- Andre C. 2001. Symposium „Recent clinical and scientific evidences supporting sublingual immunotherapy“, EACCI-Kongress, Berlin.
- Back JH. 1927. The oral administration of pollen. *J Lab Clin*, 12:1156.
- Bancherau J, Brière F, Galizzi JP, Miossec P, Rousset F. 1994. Human Interleukin-4. *J Lipid Mediators cell Signal*; 9:43-53.
- Bellinghausen I, Knop J, Saloga J. 2001. The role of interleukin 10 in the regulation of allergic immune responses. *Int Arch Allergy Immunol*, 126:97-101.
- Bellinghausen I, Metz G, Enk AH, Christmann S, Knop J, Saloga J. 1997. Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2- to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur J Immunol*, 27:1131-9.
- Bieber T, de la Salle H, Wollenberg A, et al. 1992. Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc $\epsilon$ RI). *J Exp Med*, 175:1285.
- Bieber T. Wirkmechanismen der SLIT. 2005. In: Hammer I, Hrsg. *Expressions, Informationsforum zur spezifischen Immuntherapie*.
- Briere F, Bridon JM, Chevet D, Souillet G, Bienvenu F, Guret C, Martin-Valdez H, Bancherau J. 1994. Interleukin 10 induces B Lymphocytes from IgA-deficient patients to secrete IgA. *J Clin Invest*, 94:97-104.
- Callard RE, Armitage RJ, Fanslow WC, Spriggs MK. 1993. CD40Ligand and its role in X-linked hyper-IgM syndrome. *Immunol Today*, 14:559-64.

Callard RE, Matthews DJ, Hibbert L. 1996. IL-4 and IL-13 receptors: are they one and the same? *Immunol Today*, 17:108-10.

Castell JV, Andus T, Kunz D, Heinrich PC. 1989. Interleukin-6: the major regulator of acute-phase protein synthesis in man and rat. *An NY Acad Sci; USA*, 557:86-101.

Center J, Weck AL. Hrsg. 2000. *Atlas of Immuno-Allergology*. Zweite Aufl. Seattle, Toronto, Bern, Göttingen: Hogrefe & Huber Publishers.

Chung HL, Kim WT, Kim JK, Choi EJ, Lee JH, Lee GH, Kim SG. 2005. Relationship between atopic status and nasal interleukin 10 and 11 levels in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 94(2):267-72.

Cocks BG, de Waal Malefyt R, Galizzi JP, de Vries JE, Aversa G. 1993. IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40ligand. *Int Immunol*, 5:657-63.

De Vries JE. 1998. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *J Allergy Clin Immunol*, 102(2):165-9.

De Waal Malefyt R, Yssel H, Roncarolo MG, Spits H, de Vries JE. 1992. Interleukin-10. *Curr Opin Immunol*, 4:314-20.

Devereux G. et al. 2002. Antenatal determinants of neonatal immune response to allergens. *Clin Exp Allergy*, 32:43-50.

Dolecek C, Steinberger P, Susani M, Kraft D, Valenta R, Boltz-Nitulescu G. 1995. Effects of IL-4 and IL-13 on total and allergen specific IgE production by cultured PBMC from allergic patients determined with recombinant pollen allergens. *Clin Exp Allergy*, 25(0):879-89.

Fiorentino DF, Bond MW, Mossmann TR. 1989. Two types of mouse t helper cells IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*, 170:2081-95.

- Fischöder W, Neumann M, Veltmann G. 1982. Ergebnisse der subkutanen und oralen spezifischen Hyposensibilisierung mit Inhalationsallergenen. *Allergologie*, 5:24-33.
- Frew AJ, Smith HE. 2001. Sublingual immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 107:441-4.
- Fu CL, Ye YL, Lee YL, Chiang BL. 2006. Effects of overexpression of IL-10, IL-12, TGF-beta and IL-4 on allergen induced change in bronchial responsiveness. *Respir Res*, 8;7:72.
- Fuchs T, Klimek L. 2000. Die allergenspezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) Teil 2, Orale, sublinguale und nasale Applikation. *HNO*, 48:158-64.
- Gidaro G, Marcucci F, Sensi L, Incorvaia C, Frati F, Ciprandi G. 2005. Safety of sublingual-swallow immunotherapy: an analysis of published studies. *Clin Exp Allergy*, 35:565-71.
- Giovane A, Bardare M, Ruffoni S. 1994. A three year double blind placebocontrolled study with specific oral immunotherapy to *Dermatophagoides*: evidence of safety and efficacy in paediatric patients. *Clin Exp Allergy*, 24:53-59.
- Grevers G, Röcken M. Hrsg. 2001. Taschenatlas der Allergologie. Erste Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Howard M, Farrar J, Hilfiker M, Johnson B, Takatsu K, Hamaoka T, Paul WE. 1982. Identification of a t cell derived B cell growth factor distinct from interleukin-2. *J Exp Med*, 155(3):914-23.
- Hummelshoj L, Ryder LP, Poulsen LK. 2006. The role of the interleukin-10 subfamily members in immunoglobulin production by human B cells. *Scand J Immunol*, 64(1):40-7.
- Jacobson L, Durham SR, Ebner C. 2000. Spezifische Immuntherapie, Langzeiterfolge belegt. Vortrag anlässlich des ALK-Abelló Satellitensymposium im Rahmen des 19. Kongresses der European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI) in Lissabon/Portugal. *Allergo J* 2000; 9:434.
- Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat JF, Bonnefoy JY. 1998. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *Journal of Immunology*, 160:3555-61.

Johnson JG, Jenkins MK. 1992. Co-stimulatory functions of antigen-presenting cells. *J Invest Dermatol*, 99:62.

Jung EG, Hrsg. 1995. *Dermatologie*. Dritte Aufl. Stuttgart, Hippokrates Verlag.

Kalliomäki M et al. 2001. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 357:1076-9.

Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Lindenmann J, Hrsg. 1993. *Medizinische Mikrobiologie*, Achte Aufl. Stuttgart / New York: Georg Thieme Verlag.

Keskin O, Tuncer A, Adalioglu G, Sekerel BE, Sackesen C, Kalayci O. 2006. The effects of grass pollen allergoid immunotherapy on clinical and immunological parameters in children with allergic rhinitis. *Pediatr Allergy Immunol*, 17(6):396-407.

Kishimoto T. 2005. Interleukin-6: from basic science to medicine - 40 years in immunology. *Annu Rev Immunol*, 23:1-21.

Kleine-Tebbe J, Fuchs T, Klimek L et al. 2000. Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) mit Allergenen. Positionspapier der DGAI, inhaltlich abgestimmt mit dem ÄDA. *Allergo J*, 9:317-324.

Kleine-Tebbe J, Fuchs T, Klimek L, Kühr J, Kunkel G, Lepp U, Niggemann B, Rakowski J, Renz H, Saloga J, Simon J. 2003. Spezifische Immuntherapie bei IgE-vermittelten allergischen Atemwegserkrankungen. *Deutsches Ärzteblatt*, Jg.100, 6:284-88.

Kleine-Tebbe J, Kunkel G. 1994. Wirkungsweise der allergenspezifischen Immuntherapie bei inhalativen Allergien vom Soforttyp. *Allergo J*, 3:260-5.

Klimek L. 2000. Die allergenspezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung). Teil 1 Grundlagen und subkutane Applikation. *HNO*, 48:59-67.

Klimek L, Riechelmann H, Saloga J, Mann W, Knop J. Hrsg. 1997. *Allergologie und Umweltmedizin, Einführung in Diagnostik und Therapie der Erkrankungen des oberen Respirationstraktes*. Erste Aufl. Stuttgart & New York: Schattauer-Verlag.

Kripke ML, Munn CG, Jeevan A, Tang JM, Bucana C. 1990. Evidence that cutaneous antigen presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J Immunol*, 145:2833.

Kühr J, Brauburger J, Zielen S et al. 2002. Efficacy of combination treatment with anti-IgE plus specific immunotherapy in polysensitized children and adolescents with seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*, 109:274-80.

Lee KS, Kim SR, Park HS, Park SJ, Min KH, Lee KY, Jin SM, Lee YC. 2007. Cysteinyl Leukotriene upregulates IL-11 expression in allergic airway disease of mice. *J Allergy Clin Immunol*, 119(1):141-9.

Lentsch AB, Crouch LD, Jordan JA, Czermak BJ, Yun EC, Guo R, Sarma V, Diehl KM, Ward PA. 1999. Regulatory effects of interleukin-11 during acute lung inflammatory injury. *J Leukoc Biol*, 66(1):151-7.

Lima MT, Wilson D, Pitkin L et al. 2002. Grass pollen sublingual immunotherapy for seasonal rhinoconjunctivitis: a randomized controlled trial. *Clin Exp Allergy*, 32:507-14.

Liu M, Zheng S, Wang X, Wen Z. 1999. Regulatory roles of IL-12, IL-4 and IFN-gamma on IgE synthesis in atopic patients. *Chin Med J (Engl)*, 112(6):550-3.

Lüderitz-Püchel U, Keller-Stanislawski B, Haustein D. 2001. Neubewertung des Risikos von Test- und Therapieallergenen. Eine Analyse der UAW-Meldungen von 1991 bis 2000. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz*, 44:709-18.

Maggi I, Parronchi P, Manetti R et al. 1992. Reciprocal regulatory effects of IFN- $\gamma$  and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol*, 148:2142.

Malling HJ. 1996. Sublingual immunotherapy. *Clin Exp Allergy*, 26:1228-31.

Markert UR, Niess JH, Bär C, Bach C, Hunold K, Zwacka G. 1999. Therapeutische Erfahrungen und Untersuchungen zur Wirkungsweise der sublingualen Immuntherapie im Kindesalter. *Allergologie*, 22:6-10.

- Mastrandrea F. 2004. The potential role of allergen-specific sublingual immunotherapy in atopic dermatitis. *AM J Clin Dermatol*, 5(5):281-94.
- Maurer D, Stingl G. 1995. Immunoglobulin E-binding structures on antigen-presenting cells presenting in skin and blood. *J Invest Dermatol*, 104:707.
- Modlin RL. 1994. Th1-Th2 paradigm: Insights from leprosy. *J Invest Dermatol*, 102:828.
- Möller C et al. 2002. Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-Study). *J Allergy Clin Immunol*, 109:251-6.
- Mosman TR, Sad S. 1996. The expanding universe of T cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*, 16:380-3.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffmann RL. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136:2348.
- Müller U, Hari Y, Berchtold E. 2001. Premedication with antihistamines may enhance efficacy of specific-allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 107:81-6.
- Niess JH. 2001. Analyse der Interleukin-induzierten Immunglobulin-Produktion in B-Zell-Kulturen aus dem Blut allergischer Kinder unter sublingualer und subkutaner spezifischer Immuntherapie [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Niess JH, Bär C, Schlenvoigt G, Fahlbusch B, Zwacka G, Markert UR. 2002. IL-4 supplement B-cell cultures of allergic children show reduced IgA and IgG production in response to additional stimulation with IL-10. *J Invest Allergol Clin Immunol*, 12(2):99-106.
- Noon I. 1911. Prophylactic inoculation of hay fever. *Lancet*. I:572-3.
- Oyama N et al. 2001. Antibiotic use during infancy promotes a shift in the TH1/TH2 balance toward TH2-dominant immunity in mice. *J Allergy Clin Immunol*, 107:153-9.

Pajno GB, Barberio G, De Luca F, Morabito L, Parmiani S. 2001. Prevention of new sensitizations in asthmatic children monosensitized to house dust mite by specific immunotherapy. A six-year follow-up study. *Clin Exp Allergy*, 31:1392-7.

Passalacqua G, Canonica GW. 1996. Alternative routes for allergen-specific immunotherapy. *J Invest Allergol Clin Immunol*, 6:81-7.

Passalacqua G, Canonica GW. 1995. XVI Congress of Allergology and Clinical Immunology. XVI ECACI Madrid, 1033-8.

Pickler LJ. 1994. Control of lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol*, 6:394.

Pirquet C v. 1906. Allergie. *Münch Med Wschr*, 30:1457.

Reimers A, Hari Y, Müller U. 2000. Reduction of side-effects from ultrarush immunotherapy with honeybee venom by pretreatment with fexofenadine: a double-blind, placebo-controlled trial. *Allergy*, 55:484-8.

Reinders ME, Sho M, Robertson SW, Geehan, CS, Briscoe DM. 2003. Proangiogenic function of CD40 ligand-CD40 interactions, *J Immunol*, 1;171(3):1534-41.

Renz H. 2001. Allergenkarenz - richtig oder falsch? *Allergo J*, 10:250.

Roche Lexikon Medizin. Hrsg. 1987. Zweite Aufl. München, Wien, Baltimore: Urban & Schwarzenberg-Verlag.

Romagnani S, Parronchi P, Dèlios MM, Romagnani P, Annunziato F, Piccinni MP; Manetti R, Sampognaro S, Mavilia C, De Carli M, Maggi E, Del Prete GF. 1997. An update on human Th1 and Th2 cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 113:153-6.

Rousset F, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Vezzio H, Nsu DH, Kaste H. 1992. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci*, 89:1890-3.



Savolainen J, Jacobson L, Valovirta E. 2006. Sublingual Immunotherapy in children modulates allergen-induced in vitro expression of cytokine mRNA in PBMC. *Allergy*, 61(10):1184-90.

Schäfer T. 2002. Evidence-based Medicine (EBM) und Allergie-Prävention. *Allergo J*, 11:312-9.

Schultze-Werninghaus G, Przybilla B. 2001. Allergien nehmen weiterhin zu – Was läuft falsch? *Allergo J*, 10:235.

Schwertschlag US, Trepicchio WL, Dykstra KH, Keith JC, Turner KJ, Dorner AJ. 1999. Hematopoietic, immunomodulatory and epithelial effects of interleukin-11. *Leukemia*, 13(9):1307-15.

Sennekamp J, Fuchs T, Hornung B, Kersten W, Klimek L, Leupold W, Merk H, Rebien W. 2002. Empfehlungen zur praktischen Durchführung der spezifischen Immuntherapie mit Allergenen (Hyposensibilisierung). *Allergo Journal*, 11:332-8.

Singh U, Devaraj S, Dasu MR, Ciobanu D, Reusch J, Jialal I. 2006. C-reactive protein decreases interleukin-10 secretion in activated human monocyte-derived macrophages via inhibition of cyclic AMP production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(11):2469-75.

Spiegelberg HL, O'Connor RD, Falkoff RJ, Beck L. 1991. Interleukin-4 induced IgE and IgG4 secretion by B cells from atopic dermatitis patients. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 94(1-4):181-3.

Suematsu S, Matsuda T, Aozasa K, Akira S, Nakano N, Ohno S, Miyazaki J, Yamamura K, Hirano T, Kishimoto T. 1989. IgG1 plasmacytosis in interleukin-6 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci*, 86(19):7547-51.

Taudorf E. 1992. Oral immunotherapy of adults with allergic rhinoconjunctivitis. *Dan Med Bull*, 39:542-60.

- Till S, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR. 2004. Mechanism of Immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 113(6):1025-34.
- Van Kooten C, Bancherau J. 1997. Immune regulation by CD40-CD40Ligand interactions. *Front Biosci*, 1:1-11.
- Velazquez BL, Segura DL, Barbosa DE, Vazquez MI, Tapia JG, Altamirano SC, Feria AJ. 2004. Determination of interleukins and IgG4 in patients with allergic rhinitis with and without immunotherapy. *Rev Alerg Mex*, 51(4):139-44.
- Wang J, Homer RJ, Hong L, Cohn L, Lee CG, Jung S, Elias JA. 2000. IL-11 selectively inhibits aeroallergen-induced pulmonary eosinophilia and Th2 cytokine production. *J Immunol*, 15;165(4):2222-31.
- Wheeler AW. 1997. Immunologische Adjuvanzen in Hyposensibilisierungspräparaten im Überblick: Vergangenheit, Gegenwart und Zukunft. *Allergo J*, 6:421-6.
- Wilson DR, Irani AM, Walker SM et al. 2001. Grass pollen immunotherapy inhibits seasonal increases in basophils and eosinophils in the nasal epithelium. *Clin Exp Allergy*, 31:1705-13.
- Yin T, Taga T, Tsang ML, Yasukawa K, Kishimoto T, Yang TC. 1993. Interleukin-11 mediated TF-1 cell proliferation is associated with interleukin-6 signal transducer, gp130. *J Immunol*, 151:2555-61.
- Zheng T, Zhu Z, Wang J, Homer RJ, Elias JA. 2001. IL-11: insights in asthma from overexpression transgenic modelling. *J Allergy Clin Immunol*, 108(4):489-96.
- Zielen S. 2000. Daten aus Phase-III-Studien. Neue Hoffnung für Allergiker. Griff nach den Sternen. Kongress Report. *Allergo J*, 7:1-4.
- Zwacka G, Markert UR. 2003. Therapeutic procedures of sublingual immunotherapy in clinical practice. *Chem Immunol Allergy*, 82:44-52.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Christiane Rödiger, geb. Bach  
 Wohnort: 07749 Jena, Heimstättenstr. 88  
 Geburtstag und -ort: 26.07.1974, Jena  
 Familienstand: Verheiratet, 2 Kinder

### Ausbildung:

Schule:  
 1981 bis 1990 Polytechnische Oberschule Riethnordhausen  
 1990 bis 1991 Erweiterte Oberschule Erfurt  
 1991 bis 1993 Gymnasium Erfurt  
 29.06.1993 Abitur

### Studium:

1993 bis 2001 Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
 9/1995 Physikum  
 9/1996 1. Staatsexamen  
 3/1999 2. Staatsexamen  
 4/1999 bis 8/1999 Praktisches Jahr, Dermatologie, Universitätsklinikum Jena  
 8/1999 bis 8/2000 Unterbrechung (Elternzeit 1.Kind)  
 8/2000 bis 12/2000 Praktisches Jahr, Innere Medizin, Universitätsklinikum Jena  
 12/2000 bis 3/2001 Praktisches Jahr, Chirurgie, Universitätsklinikum Jena  
 6/2001 3. Staatsexamen

### Beruflicher Werdegang:

10/2001 bis 5/2002 Arzt im Praktikum, Innere Medizin, Universitätsklinikum Jena  
 5/2002 bis 8/2003 Unterbrechung (Elternzeit 2.Kind)  
 9/2003 bis 6/2004 Arzt im Praktikum, Dermatologie, Universitätsklinikum Jena  
 Seit 7/2003 Assistenzarzt, Dermatologie, Universitätsklinikum Jena

## Publikationen:

### Artikel:

Lee H, *Roediger C*, Bauer A, Zuberbier T, Worm M. 2006. Prospective safety analysis of an ultrarush specific immunotherapy in adults with wasp venom allergy. *Allergy*, 61(10):1237-8.

Markert UR, Niess JH, Bär C, *Bach C*, Hunold K, Zwacka G. 1999. Therapeutische Erfahrungen und Untersuchungen zur Wirkungsweise der sublingualen Immuntherapie im Kindesalter. *Allergologie*, 22: 6-10.

### Vorträge:

*Rödiger C*, Schliemann S, Kaatz M, Elsner P. 2008. Neurodermitis - natürlicher Verlauf und therapeutische Einflussnahme. *Allergologie*, 31/3:111-2.

### Poster:

*Rödiger C*, Frank U, Kaatz M, Elsner P, Hipler UC. 2007. Sensibilisierung auf Nahrungsmittelallergene über die Muttermilch? JDDG, Abstraktband, 5(suppl.2):177-8.

*Rödiger C*, Hipler UC, Kaatz m, Elsner P, Bauer A. 2006. Verträglichkeit und Sicherheit einer 3-tägigen Ultrarush-Hyposensibilisierung bei Bienen- und Wespengiftallergie. *Allergologie*, 29/7:298.

*Bach C*, Markert UR, Niess J, Bär C, Hunold K, Nuske K, Junker U, Zwacka G, Jäger L. 1998. Influence of various recombinant interleukin combinations on immunoglobulin class switch in B cell cultures. International Congress of Immunology, New Delhi, India, *The Immunologist*, 1:407.

## **Danksagung**

Herrn PD Dr. U. R. Markert danke ich für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die wissenschaftliche Betreuung und die umfassende Unterstützung bei der Konzipierung, Durchführung und Auswertung der Untersuchungen.

Für die klinische Betreuung der Patienten und die Bereitstellung der zahlreichen Blutproben bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. G. Zwacka aus der Kinderklinik in Apolda.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Klinische Immunologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena bedanken, die in vielfältiger Weise zum Gelingen der Messungen beigetragen haben.

Herrn Dr. J. Niess danke ich für die Bereitstellung der Daten aus den Untersuchungen an Patienten vor Immuntherapie.

Die Durchführung der Arbeit wurde freundlich unterstützt durch ALK-Abelló-Scherax (Dänemark, Spanien, Deutschland).

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Person bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt hat: Herr PD Dr. med. Udo R. Markert,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.